

**SPE 1/RM/44 – Mars 2004**

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



# **Guide des essais de pathogénicité et de toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les organismes aquatiques et terrestres**



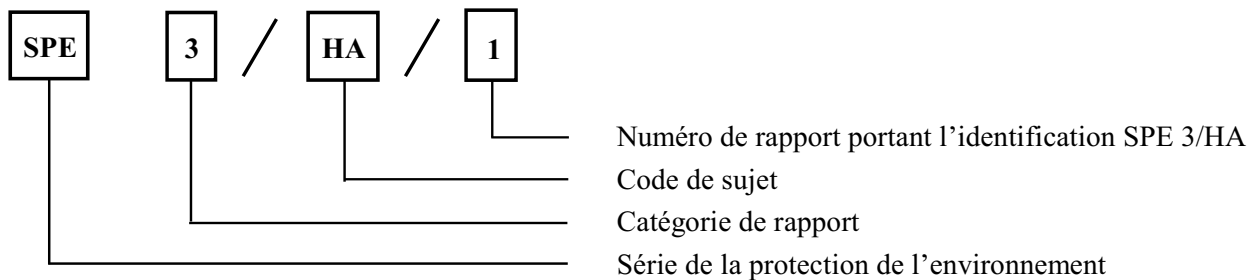
Environnement  
Canada

Environment  
Canada

Canada

# SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

## Exemple de numérotation



## Catégories

- 1 Règlements/Lignes directrices/Codes de pratiques
- 2 Évaluation des problèmes et options de contrôle
- 3 Recherche et développement technologique
- 4 Revues de la documentation
- 5 Inventaires, examens et enquêtes
- 6 Évaluations des impacts sociaux, économiques et environnementaux
- 7 Surveillance
- 8 Propositions, analyses et énoncés de principes généraux
- 9 Guides

## Sujets

- AG** Agriculture  
**AN** Technologie anaérobie  
**AP** Pollution atmosphérique  
**AT** Toxicité aquatique  
**CC** Produits chimiques commerciaux  
**CE** Consommateurs et environnement  
**CI** Industries chimiques  
**FA** Activités fédérales  
**FP** Traitement des aliments  
**HA** Déchets dangereux  
**IC** Produits chimiques inorganiques  
**MA** Pollution marine  
**MM** Exploitation minière et traitement des minéraux  
**NR** Régions nordiques et rurales  
**PF** Papier et fibres  
**PG** Production d'électricité  
**PN** Pétrole et gaz naturel  
**RA** Réfrigération et conditionnement d'air  
**RM** Méthodes de référence  
**SF** Traitement des surfaces  
**SP** Déversements de pétrole et de produits chimiques  
**SRM** Méthodes de référence normalisées  
**TS** Transports  
**TX** Textiles  
**UP** Pollution urbaine  
**WP** Protection et préservation du bois

Des sujets et des codes additionnels sont ajoutés au besoin. On peut obtenir une liste des publications de la Série de la protection de l'environnement à l'adresse suivante : Publications de la Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3.

# **Guide des essais de pathogénicité et de toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les organismes aquatiques et terrestres**

Section de l'élaboration et de l'application des méthodes  
Centre de technologie environnementale  
Environnement Canada  
Ottawa (Ontario)  
Rapport SPE 1/RM/44  
Mars 2004

**Données de catalogage avant publication de la Bibliothèque nationale du Canada**

Vedette principale au titre :

Guide des essais de pathogénicité et de toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les organismes aquatiques et terrestres

(Rapport ; SPE 1/RM/44)

Publ. aussi en anglais sous le titre : Guidance Document for Testing the Pathogenicity and Toxicity of New Microbial Substances to Aquatic and Terrestrial Organisms

Comprend des réf. bibliogr.

ISBN 0-660-96916-5

N° de cat. En49-7/1-44F

1. Micro-organismes pathogènes – Détection.
  2. Invertébrés – Agents pathogènes.
  3. Vertébrés – Agents pathogènes.
  4. Micro-organismes phytopathogènes.
  5. Essais biologiques.
  6. Écologie microbienne.
- I. Centre de technologie environnementale (Canada).  
II. Canada. Environnement Canada.  
III. Collection : Rapport (Canada. Environnement Canada) SPE 1/RM/44.

QH434.G84 2004

579'.165

C2004-980153-8

## Commentaires

---

Prière d'adresser vos commentaires et observations sur la teneur du présent rapport à :

Richard Scroggins, chef  
Division des méthodes biologiques  
Centre de technologie environnementale  
Environnement Canada  
335, River Road  
Ottawa (Ontario)  
K1A 0H3

David McBain, directeur  
Direction des substances nouvelles  
Environnement Canada  
351, boulevard Saint-Joseph  
Gatineau (Québec)  
K1A 0H3

This publication 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 pas une approbation, par Environnement Canada, de l'emploi de ces derniers. D'autres produits de valeur comparable peuvent être utilisés.



## Résumé

---

*Le présent document renferme des conseils sur les étapes préparatoires et la conduite d'essais monospécifiques servant à mesurer et à évaluer la pathogénicité et/ou la toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les organismes aquatiques et terrestres. Il est axé sur les exigences en matière de renseignements relatifs aux essais de laboratoire visant à mesurer les effets écologiques possibles de nouvelles substances microbiennes sur chacune des six catégories suivantes d'organismes d'essai (hôtes), renseignements susceptibles d'être demandés par Environnement Canada aux termes du Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (RSN), pris en application de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999) : 1) une plante aquatique; 2) un invertébré aquatique; 3) un vertébré aquatique; 4) une plante terrestre; 5) un invertébré terrestre; 6) un vertébré terrestre. Les conseils fournis ici s'adressent aux déclarants, aux consultants en environnement, aux directeurs des études et aux responsables principaux des essais. Ils faciliteront la sélection d'une série adéquate de méthodes d'essai biologique, de même que le déroulement des phases de planification, d'exécution et de rapport associées à chaque essai.*

*Des renseignements de base sont fournis sur les dispositions du Règlement sur les RSN en matière d'essais visant à déterminer les effets écologiques de nouvelles substances microbiennes, de même qu'une description de l'objet et de la portée du présent document. La section 2 (« Aperçu ») traite de questions pertinentes, notamment l'utilisation d'une série de méthodes d'essai adéquates, les éléments à prendre en compte dans la mesure de l'infectivité et des effets pathogènes et/ou toxiques des substances en cause, la nécessité de prévoir des témoins adéquats, la valeur des conclusions connexes sur l'expression environnementale de nouvelles substances microbiennes en fonction de diverses conditions de laboratoire. D'autres sections portent sur les sujets suivants : caractérisation, préparation et administration de nouvelles substances microbiennes; traitements témoins (dont des témoins négatifs et positifs); essais d'infectivité; Principes de l'OCDE de bonnes pratiques de laboratoire applicables; biosécurité en laboratoire; soin des animaux et utilisation adéquate de ceux-ci; éléments à prendre en compte lors du choix d'une série de méthodes d'essai biologique à appliquer à une nouvelle substance microbienne particulière; conseils sur la production de rapports.*

*Outre les sections susmentionnées, six autres sections renferment des conseils relatifs à la conduite des essais visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur chacune des six catégories d'organismes d'essai (hôtes). Chaque section renferme une description d'essais déjà effectués à l'aide de micro-organismes ou de produits microbiens pour la catégorie en question; les méthodes d'essai biologique recommandées (y compris des spécifications pour les essais portant sur une nouvelle substance microbienne); un examen des méthodes ou procédures de rechange à celles recommandées dans le présent document.*

*Les lignes directrices intitulées Series 885 pour les essais de pathogénicité et/ou de toxicité d'agents pesticides microbiens, publiées par la United States Environmental Protection Agency (USEPA) en 1996, ont influé sur le choix des méthodes d'essai convenant à des catégories d'organismes données. La disponibilité (et l'adaptabilité) de certaines méthodes d'essai biologique publiées par Environnement Canada a aussi été prise en compte dans le processus de sélection, tout comme l'existence de méthodes d'essai spécifiques ou de lignes directrices normalisées publiées par des organismes internationaux [Organisation de coopération et de développement économiques, American Society for Testing and Materials, Organisation internationale de normalisation (ISO), USEPA]. Les méthodes d'essai recommandées sont celles qui, avec les modifications pertinentes définies dans le présent document, conviennent aux mesures des effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des espèces choisies dans chacune des six catégories d'organismes d'essai (hôtes).*

## Abstract

---

*The intent of this document is to provide guidance on preparing for and conducting single-species tests to measure and evaluate the pathogenicity and/or toxicity of new microbial substances to aquatic and terrestrial organisms. It focuses on the information requirements with respect to laboratory tests for measuring the potential ecological effects of new microbial substances on the following six categories of test (host) organisms, that might be required by Environment Canada as part of the New Substances Notification (NSN) Regulations under the Canadian Environmental Protection Act, 1999: (1) an aquatic plant; (2) an aquatic invertebrate; (3) an aquatic vertebrate; (4) a terrestrial plant; (5) a terrestrial invertebrate; and (6) a terrestrial vertebrate. The guidance herein is intended for notifiers, environmental consultants, study directors, and principal investigators. It will assist in the selection of an appropriate series of biological test methods for measuring the pathogenicity and/or toxicity of new microbial substances, as well as in the planning, execution, and reporting phases associated with each test.*

*Background information is provided on the NSN requirements for testing new microbial substances for ecological effects, together with a description of the purpose and scope of the document. The overview (Section 2) addresses pertinent issues including the use of a series of appropriate test methods, considerations when measuring infectivity as well as pathogenic and/or toxic effects, the need for appropriate controls, and the worth of related findings that demonstrate the environmental expression of the new microbial substance under varying laboratory conditions. Other sections address the following topics: characterizing, preparing, and administering new microbial substances; control treatments in tests (including negative and positive controls); testing for infectivity; applicable (OECD) Principles of Good Laboratory Practice; laboratory biosafety; appropriate animal care and use; considerations when choosing the series of biological test methods to be applied to a particular new microbial substance; and guidance on reporting requirements.*

*Besides the foregoing, six sections of this guidance document provide guidance when performing a test for pathogenic and/or toxic effects of new microbial substances using each of the six categories of host (test) organisms. Each of these sections includes a description of previous tests performed with micro-organisms or microbial products using this category of test organisms, recommended biological test methods (including procedural specifics when testing a new microbial substance), and a consideration of alternate methods or procedures other than those recommended herein.*

*The Series 885 test guidelines for testing the pathogenicity and/or toxicity of microbial pest control agents published by the United States Environmental Protection Agency in 1996 influenced the selection of appropriate category-specific test methods. The availability (and adaptability) of certain biological test methods published by Environment Canada also influenced this selection process, as did the existence of specific test methods or standard guidelines published by international agencies (OECD, ASTM, ISO, USEPA). Recommended test methods are those which, with appropriate modifications as defined herein, are amenable to measuring the pathogenic and/or toxic effects of new microbial substances on selected species of organisms within each of these six categories of test (host) organisms.*



## Avant-propos

---

*Le présent document fait partie d'une collection de **guides** publiés par Environnement Canada (EC). Ces guides décrivent des méthodes d'essai biologique recommandées ou normalisées qui servent à mesurer et à évaluer les effets toxiques et/ou pathogènes de l'exposition d'organismes aquatiques ou terrestres à des échantillons de substances d'essai (il s'agit ici de nouvelles substances microbiennes) dans des conditions de laboratoire contrôlées et définies. Environnement Canada a évalué les méthodes recommandées et en préconise l'emploi :*

- *dans ses laboratoires d'essais d'écotoxicité;*
- *pour les essais qu'il donne en sous-traitance ou qui sont demandés par des organismes ou des entreprises de l'extérieur;*
- *en vue de l'élaboration d'instructions très explicites, comme celles qui pourraient être exigées dans un protocole réglementaire ou une méthode de référence normalisée.*

*Les différents types d'essais faisant partie de la collection ont été choisis parce qu'ils répondent aux besoins des programmes de protection et de gestion de l'environnement que mène le Ministère. Les guides ont pour objet d'orienter les utilisateurs et de faciliter la mise en œuvre de procédures cohérentes, pertinentes et intégrées en vue d'obtenir des données sur la toxicité et/ou la pathogénicité, pour les organismes aquatiques ou terrestres, de nouvelles substances microbiennes particulières destinées à être dispersées dans l'environnement.*

*Le présent guide renferme 14 tableaux résumant les procédures à suivre et les conditions à respecter au moment de mettre en œuvre les méthodes d'essai biologique recommandées ici, de même que des descriptions connexes dans le texte qui les accompagne. Certaines de ces méthodes (p. ex., EC, 2004a,b,c) n'avaient pas encore été publiées au moment de la rédaction du présent guide, tandis que d'autres pourraient être modifiées et révisées dans les années à venir. Si une des procédures ou des conditions mentionnées dans ces tableaux et dans le texte qui les accompagne diffère de celle décrite dans ces publications, il convient d'appliquer la procédure ou la condition correspondante décrite dans la méthode d'essai biologique la plus récente publiée par l'autorité compétente (c.-à-d. Environnement Canada, United States Environmental Protection Agency ou Organisation de coopération et de développement économiques).*

*L'annexe XV du Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (RSN), pris en application de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement de 1999, énumère les renseignements que doit fournir un déclarant qui veut importer ou fabriquer au Canada une nouvelle substance microbienne (micro-organisme) destinée à être dispersée dans l'environnement. Cette annexe précise les données d'essai de laboratoire à fournir en vue de déterminer les effets écologiques que peut avoir une nouvelle substance microbienne sur des espèces de plantes, d'invertébrés et de vertébrés aquatiques ou terrestres. Conformément au Règlement sur les RSN, Environnement Canada et Santé Canada (SC) ont publié conjointement un document intitulé Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : organismes (EC et SC, 2001). Ces directives incluent (§ 4.2.7.1) une brève description des méthodes d'essai biologique et des composantes des études auxquelles on peut avoir recours pour rassembler les données d'essais servant à déterminer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne sur des espèces de plantes, d'invertébrés ou de vertébrés. Le présent guide étoffe ces méthodes et vise à compléter à cet égard les directives précitées. On conseille aux proposants, notamment les déclarants et leurs délégués (p. ex., le directeur de l'étude et le ou les responsables principaux des essais; v. § 6.1), de rencontrer des représentants d'Environnement Canada et de Santé Canada dans le cadre d'une consultation avant la déclaration (v. § 1.1.6); cette rencontre devrait avoir lieu lors de la conception et de la planification de la série de méthodes d'essai biologique à appliquer aux fins du processus de déclaration, conformément au Règlement sur les RSN et aux directives précitées.*

*On trouvera à l'annexe A du présent document la liste des **guides**, des **méthodes d'essai biologique** générales (universelles) et des **méthodes de référence** normalisées publiés jusqu'à maintenant par la Section de*

*l'élaboration et de l'application des méthodes [Ottawa (Ont.)] d'Environnement Canada. Ces documents sont disponibles à l'adresse suivante : Publications de la Protection de l'environnement, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0H3, Canada. L'annexe B fournit les adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux du Service de la protection de l'environnement, qui diffuse et applique le présent guide.*

*Les termes définis dans la section « Terminologie » sont en italique lorsqu'ils sont mentionnés pour la première fois dans le texte, conformément à la définition qui en est donnée ici. L'italique sert également à mettre en évidence ces termes et certains autres.*

## Table des matières

---

<b>Résumé</b> .....	<b>v</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vi</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Liste des sigles, acronymes, abréviations et symboles</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Terminologie</b> .....	<b>xvi</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xxxiv</b>

### Section 1

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
1.1 Contexte .....	1
1.1.1 Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999) .....	1
1.1.2 Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles .....	1
1.1.3 Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : organismes .....	1
1.1.4 Substances microbiennes visées par le Règlement sur les RSN .....	2
1.1.5 Le présent guide .....	2
1.1.6 Consultation avant la déclaration .....	3
1.2 Objet et portée du présent guide .....	3
1.3 Sommaire des sujets traités dans le présent guide .....	4

### Section 2

<b>Aperçu</b> .....	<b>6</b>
---------------------	----------

### Section 3

<b>Caractérisation, préparation et administration de nouvelles substances microbiennes</b> .....	<b>10</b>
3.1 Caractéristiques connues de la matière d'essai .....	10
3.2 Matière d'essai et mode(s) d'exposition .....	11
3.3 Détermination et expression des concentrations ou doses expérimentales .....	16
3.3.1 Essai à concentration unique et CDM (ou DDM) .....	16
3.3.1.1 Administration de la CDM dans l'eau d'essai – organismes aquatiques .....	17
3.3.1.2 Administration de la CDM dans le sédiment d'essai – invertébrés aquatiques .....	18
3.3.1.3 Administration de la CDM dans les aliments d'essai – animaux aquatiques .....	19
3.3.1.4 Administration de la CDM dans l'eau d'essai – plantes terrestres .....	19
3.3.1.5 Administration de la CDM dans le sol d'essai – plantes terrestres ou invertébrés endogés .....	19
3.3.1.6 Administration de la CDM – invertébrés terrestres phytophiles .....	20
3.3.1.7 Administration de la CDM dans les aliments d'essai – invertébrés endogés .....	21
3.3.1.8 Administration de la DDM par gavage – oiseaux .....	21
3.3.1.9 Administration de la DDM par inhalation – oiseaux .....	21
3.3.1.10 Administration de la DDM par gavage – rongeurs .....	21
3.3.1.11 Administration de la DDM par inhalation – rongeurs .....	22
3.3.2 Essai à concentrations multiples .....	22
3.4 Préparation et administration des concentrations expérimentales .....	23
3.4.1 Mélange et administration dans l'eau .....	23
3.4.2 Mélange et administration dans le sédiment .....	25
3.4.3 Mélange et administration dans le sol .....	26
3.4.4 Mélange et administration dans les aliments .....	28
3.4.5 Administration par voie orale (gavage) .....	29
3.4.6 Administration par inhalation .....	30
3.5 Quantification de la concentration de micro-organismes .....	31

*Section 4*

<b>Traitements témoins</b> .....	<b>35</b>
4.1 Témoin négatif .....	35
4.2 Témoin chimique positif .....	35
4.3 Témoin microbien positif .....	36
4.4 Témoin non infectieux .....	37
4.5 Témoin sur filtrat stérile .....	39

*Section 5*

<b>Essais d'infectivité</b> .....	<b>41</b>
-----------------------------------	-----------

*Section 6*

<b>Principes de bonnes pratiques de laboratoire</b> .....	<b>45</b>
6.1 Organisation et personnel de l'installation d'essai .....	46
6.2 Programme d'assurance de la qualité .....	47
6.3 Installations .....	48
6.4 Appareils, matières et réactifs .....	48
6.5 Systèmes d'essai .....	49
6.6 Substances d'essai .....	50
6.7 Modes opératoires normalisés .....	50
6.8 Réalisation de l'étude .....	51
6.9 Établissement du rapport sur les résultats de l'étude .....	51
6.10 Stockage et conservation des archives et des matières .....	52

*Section 7*

<b>Biosécurité en laboratoire, soin et utilisation des animaux</b> .....	<b>53</b>
7.1 Biosécurité en laboratoire .....	53
7.2 Soins et utilisation des animaux .....	56

*Section 8*

<b>Choix des organismes d'essai et des méthodes d'essai biologique</b> .....	<b>61</b>
8.1 Les six catégories de méthodes d'essai biologique .....	61
8.2 Méthodes d'essai biologique recommandées et autres méthodes .....	62
8.3 Essais sur des plantes, des invertébrés ou des vertébrés aquatiques .....	64
8.4 Essais sur des amphibiens .....	66
8.5 Essais sur des plantes terrestres .....	66
8.6 Essais sur des invertébrés terrestres .....	67
8.7 Essais sur des vertébrés terrestres .....	69
8.8 Questionnaire .....	70

*Section 9*

<b>Essais sur des plantes aquatiques</b> .....	<b>71</b>
9.1 Plantes dulcicoles .....	71
9.1.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens .....	71
9.1.2 Méthode d'essai biologique recommandée .....	71
9.1.3 Autres méthodes ou procédures .....	73
9.2 Plantes estuariennes ou marines .....	76
9.2.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens .....	76
9.2.2 Méthode d'essai biologique recommandée .....	77
9.2.3 Autres méthodes ou procédures .....	80

*Section 10*

<b>Essais sur des invertébrés aquatiques</b> .....	<b>82</b>
10.1 Invertébrés dulcicoles .....	82
10.1.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens .....	82
10.1.2 Méthode d'essai biologique recommandée pour les invertébrés pélagiques .....	83
10.1.3 Méthodes d'essai biologique recommandées pour les invertébrés endogés .....	86
10.1.4 Autres méthodes ou procédures .....	87
10.1.4.1 Essais de remplacement – invertébrés pélagiques .....	87
10.1.4.2 Essais de remplacement – invertébrés endogés .....	92
10.1.4.3 Essais sur des micro-organismes mésophiles ou psychrophiles .....	92
10.2 Invertébrés estuariens ou marins .....	93
10.2.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens .....	93
10.2.2 Méthode d'essai biologique recommandée pour les invertébrés épibenthiques .....	94
10.2.3 Méthode d'essai biologique recommandée pour les invertébrés benthiques (endofaune) .....	98
10.2.4 Autres méthodes ou procédures .....	99
10.2.4.1 Essais de remplacement – invertébrés épibenthiques .....	99
10.2.4.2 Essais de remplacement – invertébrés endogés .....	103

*Section 11*

<b>Essais sur des vertébrés aquatiques</b> .....	<b>106</b>
11.1 Poissons d'eau douce .....	106
11.1.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens .....	106
11.1.2 Méthode d'essai biologique recommandée .....	107
11.1.3 Autres méthodes ou procédures .....	111
11.2 Poissons d'estuaire ou d'eau de mer .....	112
11.2.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens .....	112
11.2.2 Méthode d'essai biologique recommandée .....	113
11.2.3 Autres méthodes ou procédures .....	116

*Section 12*

<b>Essais sur des plantes terrestres</b> .....	<b>118</b>
12.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens .....	118
12.2 Méthode d'essai biologique recommandée .....	119
12.3 Autres méthodes ou procédures .....	123

*Section 13*

<b>Essais sur des invertébrés terrestres</b> .....	<b>126</b>
13.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens .....	126
13.2 Méthodes d'essai biologique recommandées .....	128
13.2.1 Abeilles domestiques .....	128
13.2.2 Vers de terre .....	129
13.2.3 Collemboles .....	133
13.3 Autres méthodes ou procédures .....	136
13.3.1 Essais sur des invertébrés terrestres phytophiles .....	136
13.3.2 Essais sur des invertébrés endogés .....	138

*Section 14*

<b>Essais sur des vertébrés terrestres</b> .....	<b>139</b>
14.1 Oiseaux .....	139
14.1.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens .....	139
14.1.2 Méthode d'essai biologique recommandée .....	140
14.1.3 Autres méthodes ou procédures .....	145

14.2	Petits mammifères .....	146
14.2.1	Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens .....	146
14.2.2	Méthode d'essai biologique recommandée .....	148
14.2.3	Autres méthodes ou procédures .....	153
 <i>Section 15</i>		
	<b>Conseils sur les rapports à produire .....</b>	<b>155</b>
	<b>Ouvrages cités .....</b>	<b>157</b>
 <i>Annexe A</i>		
	<b>Méthodes d'essai biologiques et documents d'orientation publiés par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada .....</b>	<b>167</b>
 <i>Annexe B</i>		
	<b>Administration centrale et bureaux régionaux d'Environnement Canada .....</b>	<b>170</b>
 <i>Annexe C</i>		
	<b>Membres du comité consultatif scientifique .....</b>	<b>171</b>
 <i>Annexe D</i>		
	<b>Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais de pathogénicité et/ou de toxicité .....</b>	<b>173</b>

## Liste des tableaux

---

1	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 7 jours sur le macrophyte dulcicole <i>Lemna minor</i> .....	74
2	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 9 jours sur la macroalgue rouge <i>Champia parvula</i> .....	78
3	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 21 jours sur le cladocère dulcicole <i>Daphnia magna</i> .....	84
4	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 10 jours sur des larves de <i>Chironomus tentans</i> ou de <i>C. riparius</i> .....	88
5	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 14 jours sur l'amphipode dulcicole <i>Hyalella azteca</i> .....	90
6	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 30 jours sur le bouquet euryhalin <i>Palaemonetes vulgaris</i> .....	96
7	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 28 jours sur le mollusque bivalve euryhalin <i>Macoma balthica</i> .....	100
8	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 28 jours sur des poissons juvéniles acclimatés à l'eau douce .....	108
9	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 28 jours sur des poissons juvéniles acclimatés à l'eau de mer .....	114
10	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité sur diverses espèces de plantes terrestres .....	120
11	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 56 jours sur des vers de terre ( <i>Eisenia andrei</i> ) .....	130
12	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 28 jours sur des collemboles ( <i>Folsomia candida</i> ) .....	134
13	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 30 jours sur le canard colvert ( <i>Anas platyrhynchos</i> ) ou le colin de Virginie ( <i>Colinus virginianus</i> ) .....	142
14	Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de $\geq 21$ jours sur des rats ou des souris .....	150

## Liste des sigles, acronymes, abréviations et symboles

---

AAM	agent antiparasitaire microbien
ACIA	Agence canadienne d'inspection des aliments
ARLA	Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (Santé Canada)
ASTM	American Society for Testing and Materials
BPL	bonnes pratiques de laboratoire
CCPA	Conseil canadien de protection des animaux
CDM	concentration de danger maximal
CE <sub>50</sub>	concentration efficace médiane
CI <sub>25</sub>	concentration inhibitrice 25 %
CI <sub>p</sub>	concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)
CL <sub>50</sub>	concentration létale médiane
cm	centimètre
CMEO	concentration minimale avec effet observé
CSEO	concentration sans effet observé
DDM	dose de danger maximal
DE <sub>50</sub>	dose efficace médiane
DI <sub>25</sub>	dose inhibitrice 25 %
DI <sub>p</sub>	dose inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)
DL <sub>50</sub>	dose létale médiane
DMEO	dose minimale avec effet observé
DSEO	dose sans effet observé
DSN	Direction des substances nouvelles
EC	Environnement Canada
ET	écart-type
g	gramme
h	heure
HEPA	filtre à particules à haute efficacité
ISO	Organisation internationale de normalisation
kg	kilogramme
L	litre
LCPE	<i>Loi canadienne sur la protection de l'environnement</i>
LIS	Liste intérieure des substances
m	mètre
MD <sup>(MD)</sup>	marque déposée
µg	microgramme
µL	microlitre
µmol	micromole
mg	milligramme
mL	millilitre
mm	millimètre
nm	nanomètre
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OD	oxygène dissous
OPPTS	Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (USEPA)
PC	préparation commerciale (microbienne)
pH	concentration en ions hydrogène
RSN	renseignements concernant les substances nouvelles
s	seconde
SC	Santé Canada



sp.	espèce
spp.	espèces
syn.	synonyme
tr/min	tours par minute
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV	(rayonnement) ultraviolet
v.	voir
°C	degré Celsius
>	plus de
<	moins de
≥	plus de ou égal à
≤	moins de ou égal à
%	pour cent
‰	pour mille; parties par millier (salinité);
=	égale
+	plus
-	moins
±	plus ou moins
×	fois
÷	divisé par
/	par; peut aussi signifier « ou » (p. ex., rétention/acclimatation)
~	environ
§	sous-section

## Terminologie

---

Nota : Toutes les définitions ci-dessous s'inscrivent dans le contexte du présent guide; 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*) exprime l'autorisation ou la capacité d'accomplir une action.

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

### Termes techniques

*À renouvellement intermittent* – Se dit d'un essai sur des plantes ou des animaux aquatiques pendant lequel les concentrations expérimentales sont renouvelées (remplacées) à des intervalles préétablis. Syn. : à renouvellement périodique.

*AAM* ou *agent antiparasitaire microbien* – Culture pure ou consortium (c.-à-d. une combinaison naturelle complexe non préparée) de micro-organismes qui, après son mélange avec d'autres ingrédients (p. ex., agents anti-UV, agents de mise en suspension, porteurs, substances d'enrobage, mouillants) donne une *préparation commerciale* convenant à la lutte antiparasitaire. [V. aussi *consortium (de micro-organismes)*, *préparation commerciale* et *substance*.]

*Acclimatation* – Adaptation physiologique à une valeur précise d'un ou de plusieurs facteurs environnementaux, comme la température. Ce terme désigne habituellement l'adaptation à des conditions de laboratoire contrôlées pendant une période donnée.

*Aérosolisation* – Mélange et dispersion d'une substance d'essai dans l'air, sous forme de pulvérisation fine de particules colloïdales. Syn. : pulvérisation en aérosol.

*Agent antiparasitaire microbien* – Voir *AAM*.

*Aigu* – Qui se manifeste après une courte période d'exposition (secondes, minutes, heures ou quelques jours) relativement à la durée de vie de l'organisme d'essai.

*Alevin* – Salmonidé éclos depuis peu, qui n'a pas commencé à se nourrir et qui est doté d'une vésicule vitelline visible comblant ses besoins nutritifs. La truite ou le saumon ayant atteint ce stade de développement sont souvent appelés « alevins vésiculés ».

*Alevin nageant* – Jeune salmonidé ayant dépassé le stade larvaire et ayant commencé à se nourrir activement.

*Analgésique* – Substance médicamenteuse qui, absorbée par voie orale, soulage une douleur systémique ou localisée.

*Anesthésique* – Agent chimique (ou substance médicamenteuse) provoquant une insensibilité partielle ou totale au toucher ou à la douleur. Un anesthésique général a un effet sur le corps entier, habituellement avec perte de conscience, tandis qu'un anesthésique local abolit la sensibilité à la douleur d'une partie du corps.

*Antimicrobien* – Se dit de toute substance naturelle, semi-synthétique ou synthétique capable de détruire des micro-organismes ou d'en ralentir la prolifération. Les antimicrobiens comprennent notamment des antibiotiques, antiviraux, antifongiques, désinfectants, antiseptiques, agents de conservation des aliments destinés aux humains et aux animaux, pesticides, biocides, produits de conservation du bois. [V. aussi *micro-organisme*.]

*Arthropodes* – Animaux aquatiques ou terrestres de l'embranchement *Arthropoda*, qui comprend les araignées, les crabes, les insectes, les mille-pattes, etc. Ces animaux sont pourvus d'un squelette externe chitineux et articulé, d'un corps segmenté et de paires de pattes articulées.

*Autopsie* – Examen post-mortem comportant une inspection soigneuse des surfaces et parties externes et internes de l'organisme mort en vue de détecter tout signe d'apparence atypique. L'autopsie peut également comprendre un examen histologique de certains organes ou tissus.

*Benthique* – Se dit des animaux ou des plantes vivant à la surface (*épibenthiques*) ou à l'intérieur (*endobenthiques*) des sédiments qui se sont déposés sur le fond d'une masse d'eau. [V. aussi *endofaune* et *épibenthique*.]

*Biomarqueur* – Mesure biochimique, génétique, *immunologique* ou physiologique précise indiquant la possibilité qu'une *nouvelle substance microbienne* ait un effet nocif sur la santé ou l'état (p. ex., la survie, la croissance, le développement, l'infection) des organismes d'essai (hôtes). [V. aussi *nouvelle substance microbienne* et (*processus*) *immunologiques*.]

*Biorestauration* – Utilisation de micro-organismes choisis et adaptés à la *décontamination* pour réduire ou éliminer les *substances toxiques* d'un lieu contaminé. [V. aussi *décontamination*, *produit microbien*, *substance* et *toxique*.]

*Bonnes pratiques de laboratoire* – Voir *BPL*.

*BPL* ou *bonnes pratiques de laboratoire* – Système de contrôle de la qualité relatif au processus organisationnel et aux conditions dans lesquelles les études environnementales menées en laboratoire sont planifiées, mises en œuvre, surveillées, consignées, archivées et déclarées.

*Cancérogène* – Qui peut provoquer le cancer. [V. aussi *cancérogénicité*.]

*Cancérogénicité* – Capacité ou tendance à provoquer le cancer. [V. aussi *cancérogène*.]

*Carte de contrôle* – Graphique servant à suivre l'évolution des effets mesurés du *toxique de référence*. La date de l'essai se trouve sur l'axe horizontal; sur l'axe logarithmique vertical, on porte la concentration à laquelle l'effet est observé. [V. aussi (*essai avec*) *témoin chimique positif* et *toxique de référence*.]

*CDM* ou *concentration de danger maximal* – Concentration fondée sur un facteur de sécurité donné, multiplié par la *concentration* la plus élevée de la *substance d'essai* (exprimée en unités microbiennes par millilitre ou kilogramme de masse sèche du *substrat d'essai*) à laquelle des groupes d'organismes aquatiques ou terrestres pourraient être exposés dans le milieu naturel après application de ladite substance à la dose maximale recommandée. Voir la sous-section 3.3 pour de plus amples détails, y compris les définitions de la CDM pour des essais particuliers. [V. aussi *concentration*, *substance d'essai* et *substrat (d'essai)*.]

*CE<sub>50</sub>* ou *concentration efficace médiane* – Concentration (dans le présent contexte, nombre d'unités microbiennes par millilitre ou gramme de masse sèche du *substrat d'essai*) de la *substance d'essai* (dans le présent contexte, une *nouvelle substance microbienne*) administrée dans un *substrat d'essai* (eau, sédiment ou sol), qui est censée avoir un effet nocif défini sur 50 % des *organismes d'essai*. Dans la plupart des cas, la CE<sub>50</sub> et ses limites de confiance de 95 % sont dérivées de l'analyse statistique du pourcentage d'organismes chez lesquels l'effet se fait sentir (p. ex., signes de dommages ou anomalies apparentes tissulaires, réaction d'évitement de la

part des organismes motiles, comportement atypique évident) à diverses concentrations, après une période fixe d'exposition. La durée de l'exposition doit être précisée (p. ex., 72 h ou 30 jours). La  $CE_{50}$  sert à décrire des *effets quantiques*, létaux ou sublétaux, et non pas des effets continus (c.-à-d. *quantitatifs*). [V. aussi  $CI_p$ , *concentration*, *effet quantique*, *effet quantitatif*, *nouvelle substance microbienne*, *substance d'essai* et *substrat (d'essai)*.]

*Chlorose* – État provoqué par une déficience en chlorophylle des parties vertes d'une plante; les feuilles de la plante touchée sont vert pâle ou jaunes. Cet état peut avoir diverses causes : maladie, substances toxiques, déficience en éléments nutritifs, mutation génétique ou sénescence.

*Chronique* – Qui se produit pendant une période d'exposition relativement longue, habituellement une partie appréciable (p. ex., 10 % ou plus) de la durée de vie d'un organisme.

$CI_{25}$  – Voir  $CI_p$ .

$CI_p$  ou *concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)* – Estimation ponctuelle de la concentration de la *substance d'essai* (dans le présent contexte, le nombre d'unités microbiennes de la *nouvelle substance microbienne* par millilitre ou gramme de masse sèche du *substrat d'essai*) qui inhibe, selon le pourcentage précisé (p), un paramètre biologique *quantitatif*, par exemple, le nombre de jeunes produits ou la taille des sujets à la fin de l'essai, par rapport au groupe témoin. La  $CI_p$  est souvent calculée et exprimée sous forme de  $CI_{25}$  (c.-à-d. la concentration d'une substance d'essai qui inhibe, dans une proportion de 25 %, la croissance ou un autre paramètre *quantitatif* par rapport au groupe témoin) ou de  $CI_{20}$ . [V. aussi *concentration*, *nouvelle substance microbienne*, *substance d'essai* et *substrat (d'essai)*.]

$CL_{50}$  ou *concentration létale médiane* – Concentration (dans le présent contexte, le nombre d'unités microbiennes par millilitre ou gramme de masse sèche du *substrat d'essai*) de la *substance d'essai* (dans le présent contexte, une *nouvelle substance microbienne*) dans le substrat d'essai (eau, sédiment ou sol), qui est censée avoir un effet nocif défini sur 50 % des organismes d'essai. La  $CL_{50}$  et ses limites de confiance de 95 % sont normalement dérivées de l'analyse statistique du pourcentage des mortalités survenues à chacune des cinq concentrations expérimentales ou plus, après une période d'exposition donnée. La durée de l'exposition doit être précisée (p. ex.,  $CL_{50}$  7 jours ou  $CL_{50}$  30 jours). [V. aussi *concentration*, *nouvelle substance microbienne*, *substance d'essai* et *substrat (d'essai)*.]

*Cladocère* – Puce d'eau (espèce de daphnie).

*Clairance* – Élimination des micro-organismes d'un organe interne du corps d'un animal par des mécanismes cellulaires ou extracellulaires. Dans le cas des systèmes immunitaires primitifs et évolués des invertébrés et des vertébrés, ce terme sert à décrire un processus complexe (dans le temps et l'espace) qui débute par des interactions entre des macrophages ou des cellules de la lignée monocyte (mammifères) associées à l'adhérence, à l'ingestion et à la destruction ou à la dégradation des microbes envahissants. Ce processus mène à l'inactivation et à l'élimination (translocation) des micro-organismes « étrangers » introduits dans l'organisme par le biais d'un ou de plusieurs modes d'exposition.

*CMEO* ou *concentration minimale avec effet observé* – Concentration minimale de la *substance d'essai* (dans le présent contexte, une *nouvelle substance microbienne*) causant, chez les organismes qui y sont exposés, un effet statistiquement significatif par rapport au groupe témoin. [V. aussi *concentration*, *nouvelle substance microbienne* et *substance d'essai*.]

*Concentration* – Quantité d'une *substance* que contient une unité de quantité d'un milieu donné. Dans le contexte du présent guide, le terme *substance* désigne le plus souvent une *nouvelle substance microbienne* et le terme milieu, un *substrat d'essai* (p. ex., eau, sédiment, sol ou aliment). Syn. : teneur. [V. aussi *dose*, *eau d'essai*, *microbien*, *nouvelle substance microbienne*, *sédiment d'essai*, *sol d'essai*, *substance* et *substrat (d'essai)*.]

*Concentration de danger maximal* – Voir *CDM*.

*Concentration efficace médiane* – Voir *CE<sub>50</sub>*.

*Concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)* – Voir *CI<sub>p</sub>*.

*Concentration létale médiane* – Voir *CL<sub>50</sub>*.

*Concentration minimale avec effet observé* – Voir *CMEO*.

*Concentration sans effet observé* – Voir *CSEO*.

*Consortium (de micro-organismes)* – Mélange complexe non préparé de micro-organismes isolés de l'environnement. Un consortium de micro-organismes est considéré comme une *substance* distincte et est inclus dans la définition de *micro-organisme*. [V. aussi *matière d'essai, mélange (de micro-organismes), micro-organisme, nouvelle substance microbienne, substance* et *substrat d'essai*.]

*Contaminant* – Substance présente dans un système naturel ou présente à une concentration plus forte qu'à l'accoutumée, en raison, directement ou non, de l'activité humaine. Ce terme désigne souvent les substances présentes à des concentrations susceptibles d'avoir des effets biologiques nocifs.

*Contrôle* – Voir *témoin*.

*Contrôle de la qualité* – Actions précises prévues dans le programme d'*assurance de la qualité* : normalisation, étalonnage, répétition, échantillons témoins et estimations statistiques des limites relatives aux données. [V. aussi (*programme d'assurance de la qualité*).]

*Cotylédon* – Feuille primordiale se développant à partir de l'embryon d'une plante; il y en a une seule chez les monocotylédones et deux chez les dicotylédones. Chez de nombreuses espèces de dicotylédones, comme le haricot, les cotylédons sortent du sol et forment les premières feuilles. [V. aussi *dicotylédones* et *monocotylédones*.]

*Croissance* – Accroissement de la taille ou de la masse d'un organisme par suite de la multiplication cellulaire; les nouvelles cellules s'ajoutent au tissu existant ou forment de nouveaux tissus. Dans les méthodes d'essai biologique du présent guide, ce terme désigne une augmentation de la masse sèche.

*CSEO* ou *concentration sans effet observé* – Concentration maximale de la *substance d'essai* (dans le présent contexte, une *nouvelle substance microbienne*) dans le *substrat d'essai* ne causant, chez les organismes qui y sont exposés, aucun effet statistiquement significatif par rapport au groupe témoin. [V. aussi *concentration, nouvelle substance microbienne, substance d'essai* et *substrat (d'essai)*.]

*Cystocarpe* – Excroissance structurale bulbeuse qui se forme sur les macroalgues rouges (p. ex., *Champia parvula*) après la reproduction sexuée. Cette excroissance, facilement reconnaissable, produit des spores.

*DDM* ou *dose de danger maximal* – Dose fondée sur un facteur de sécurité donné, multiplié par la *dose* la plus élevée de la substance d'essai à laquelle des oiseaux ou de petits mammifères sont exposés à une occasion (s'il s'agit de rongeurs) ou à plus d'une occasion (s'il s'agit d'oiseaux). Voir la sous-section 3.3 pour de plus amples détails, y compris les définitions de la *DDM* pour des essais particuliers. [V. aussi *dose* et *substance d'essai*.]

*DE<sub>50</sub>* ou *dose efficace médiane* – Dose de la *substance d'essai* (dans le présent contexte, une *nouvelle substance microbienne*) administrée par voie orale ou par inhalation à une ou plus d'une occasion, qui est censée avoir un effet nocif défini sur 50 % des *organismes d'essai*. Ce terme s'applique aux essais menés sur des oiseaux ou de

petits mammifères exposés à des doses multiples d'une suspension aqueuse d'une nouvelle substance microbienne, chaque dose étant administrée par voie orale (gavage) ou par inhalation. Dans la plupart des cas, la  $DE_{50}$  et ses limites de confiance de 95 % sont dérivées de l'analyse statistique du pourcentage d'organismes chez lesquels l'effet se fait sentir (p. ex., signes de dommages ou anomalies apparentes tissulaires, comportement atypique évident) à diverses doses, après une période fixe d'exposition. La durée de l'exposition doit être précisée (p. ex., 30 jours). La  $DE_{50}$  sert à décrire des *effets quantiques*, létaux ou sublétaux, et non pas des *effets quantitatifs*. [V. aussi  $DI_p$ , dose, effet quantique, effet quantitatif, nouvelle substance microbienne et substance d'essai.]

*Déclarant* – Résident canadien qui se propose d'importer ou de fabriquer une *substance nouvelle* au Canada et qui fournit à la Direction des substances nouvelles d'Environnement Canada les renseignements exigés dans une annexe du *Règlement sur les RSN*. Si le déclarant n'est pas un résident canadien, il doit indiquer le nom et l'adresse d'un agent canadien. [V. aussi *nouvelle substance microbienne*.]

*Décontamination* – Gestion d'un lieu contaminé dans le but de prévenir, de réduire au minimum ou d'atténuer ses incidences sur la santé humaine ou l'environnement. La décontamination peut comprendre à la fois des interventions directes (p. ex., élimination, destruction et confinement des substances toxiques) et des mesures institutionnelles (p. ex., zonage ou décrets). Elle peut aussi faire appel à une *nouvelle substance microbienne* ou à un *produit microbien* afin de détruire, de réduire ou d'éliminer les *substances toxiques* d'un lieu contaminé, auquel cas on parle de *biorestauration*. [V. aussi *biorestauration*, *nouvelle substance microbienne* et *produit microbien*.]

$DI_{25}$  – Voir  $DI_p$ .

*Dicotylédones* – Dans la classification des plantes, espèces portant deux *cotylédons*. [V. aussi *cotylédon* et *monocotylédones*.]

$DI_p$  ou *dose inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)*. Dose de la *substance d'essai* (dans le présent contexte, une *nouvelle substance microbienne*) administrée par voie orale (gavage) ou par inhalation à une ou plus d'une occasion, qui inhibe, selon le pourcentage précisé (p), un paramètre biologique *quantitatif*, par exemple le nombre de jeunes produits ou la taille des sujets à la fin de l'essai, par rapport au groupe témoin. Ce terme s'applique aux essais menés sur des oiseaux ou de petits mammifères exposés à des doses multiples d'une suspension aqueuse d'une nouvelle substance microbienne, chaque dose étant administrée par voie orale (gavage) ou par inhalation. La  $DI_p$  est souvent calculée et exprimée sous forme de  $DI_{25}$  (c.-à-d. la dose d'une substance d'essai qui inhibe, dans une proportion de 25 %, la croissance ou un autre paramètre *quantitatif* par rapport au groupe témoin) ou de  $DI_{20}$ . [V. aussi *dose*, *nouvelle substance microbienne* et *substance d'essai*.]

*Directeur de l'étude* – Personne responsable de la conduite générale de l'étude. [V. aussi *étude*.]

$DL_{50}$  ou *dose létale médiane* – Dose de *substance d'essai* (dans le présent contexte, une *nouvelle substance microbienne*) administrée par voie orale (gavage) ou par inhalation à une ou plus d'une occasion, qui est censée être létale pour 50 % des organismes d'essai. Ce terme s'applique aux essais menés sur des oiseaux ou de petits mammifères exposés à des doses multiples d'une suspension aqueuse d'une nouvelle substance microbienne, chaque dose étant administrée par voie orale (gavage) ou par inhalation. La  $DL_{50}$  et ses limites de confiance de 95 % sont normalement dérivées de l'analyse statistique du pourcentage de mortalités survenues à chacune des cinq concentrations expérimentales ou plus, après une période d'exposition donnée. La durée de l'exposition doit être précisée (p. ex.,  $DL_{50}$  30 jours ou  $DL_{50}$  90 jours). [V. aussi *dose*, *nouvelle substance microbienne* et *substance d'essai*.]

*DMEO* ou *dose minimale avec effet observé* – Dose minimale de la *substance d'essai* (dans le présent contexte, une *nouvelle substance microbienne*) causant, chez les organismes qui y sont exposés, un effet statistiquement significatif par rapport au groupe témoin. [V. aussi *dose*, *nouvelle substance microbienne* et *substance d'essai*.]

*Données brutes* – Ensemble des comptes rendus et des documents originaux (ou des copies conformes de ceux-ci) obtenus et consignés par le laboratoire d'essai, qui résultent des observations et des travaux réalisés dans le cadre d'une étude. Les données brutes peuvent inclure des photographies, des données sur support informatique, des relevés d'observations sur cassette, des enregistrements automatiques de données ou tout autre moyen de conservation de données réputé capable d'assurer un stockage des informations en toute sécurité.

*Donneur d'ordre* – Personne morale qui commande, parraine ou soumet une étude de sécurité ayant trait à l'environnement.

*Dose* – Quantité totale d'une *substance* qui est administrée à un organisme ou qui est ingérée ou absorbée par celui-ci. Dans le contexte du présent guide, la substance est le plus souvent une *nouvelle substance microbienne* et le terme « dose » s'applique à la quantité totale administrée à des oiseaux ou à de petits mammifères par *gavage* ou par *inhalation* à une occasion (s'il s'agit de rongeurs) ou à plus d'une occasion (s'il s'agit d'oiseaux). [V. aussi *concentration, gavage, nouvelle substance microbienne, produit microbien et substance.*]

*Dose de danger maximal* – Voir *DDM*.

*Dose efficace médiane* – Voir *DE<sub>50</sub>*.

*Dose inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)* – Voir *DI<sub>p</sub>*.

*Dose létale médiane* – Voir *DL<sub>50</sub>*.

*Dose minimale avec effet observé* – Voir *DMEO*.

*Dose sans effet observé* – Voir *DSEO*.

*DSEO* ou *dose sans effet observé* – Dose maximale de la *substance d'essai* (dans le présent contexte, une *nouvelle substance microbienne*) dans le *substrat d'essai* ne causant, chez les organismes qui y sont exposés, aucun effet statistiquement significatif par rapport au groupe témoin. [V. aussi *dose, nouvelle substance microbienne, substance d'essai et substrat (d'essai).*]

*Eau d'essai* – Eau d'estuaire, eau de mer ou eau douce utilisée dans un essai sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une *nouvelle substance microbienne* sur des plantes, des invertébrés ou des vertébrés aquatiques. Il s'agit d'un échantillon ou d'un sous-échantillon d'eau *non contaminée* utilisée comme *substrat d'essai* ou, dans le cas d'expériences faisant appel à de l'eau d'essai et à un sédiment d'essai, comme *eau sus-jacente*. L'eau d'essai peut provenir d'une source naturelle non contaminée ou être préparée en laboratoire au moyen d'un mélange donné de sels non contaminés dans une eau désionisée ou distillée, selon un ratio permettant d'obtenir les caractéristiques souhaitées (p. ex., dureté ou salinité) convenant à un *organisme d'essai* donné et à une *méthode d'essai biologique* particulière. Dans certains cas, *eau d'essai* désigne également une eau préparée pour ou dans des enceintes expérimentales, y compris un échantillon ou sous-échantillon d'eau témoin négatif, d'eau de référence ou de tout traitement renfermant une concentration donnée de *matière d'essai*. [V. aussi *eau sus-jacente, matière d'essai, non contaminé, nouvelle substance microbienne et substrat (d'essai).*]

*Eau de porosité* – Eau occupant l'intervalle entre les particules de sédiment. Syn. : eau interstitielle.

*Eau sus-jacente* – *Eau d'essai* qui recouvre le *sédiment d'essai* dans une *enceinte expérimentale*. [V. aussi *eau d'essai et sédiment d'essai.*]

*Eau témoin/de dilution* – Eau d'essai utilisée pour la préparation des *témoins* ainsi que de la ou des concentrations de la *nouvelle substance microbienne* à inclure dans un essai. [V. aussi *eau d'essai, nouvelle substance microbienne* et *témoin*.]

*Écotoxicologie* – Subdivision de la *toxicologie* ayant la même définition générale; toutefois, elle s'intéresse avant tout aux écosystèmes, aux communautés naturelles et aux espèces sauvages, sans exclure les humains des écosystèmes. [V. aussi *toxicologie*.]

*Écozone* – Région géographique particulière délimitée par des caractéristiques écologiques définies qui lui sont propres. On trouvera à l'annexe 2 de EC et SC (2001) une carte des quinze régions du Canada définies comme des écozones distinctes.

*Effet* – Changement survenant dans l'état ou la dynamique d'un système par suite de l'action d'un agent. Dans le présent contexte, « système » désigne l'organisme ou les *organismes d'essai*, et « agent », une *nouvelle substance microbienne* ou, dans certains cas, un *produit microbien*. [V. aussi *nouvelle substance microbienne, organisme, (organisme) hôte* et *produit microbien*.]

*Effet quantique* – Dans un essai de pathogénicité et/ou de toxicité, effet auquel chaque *organisme d'essai* réagit ou ne réagit pas. Par exemple, la réaction d'un animal exposé à une eau, un sédiment ou un sol d'essai contaminés peut être la mort ou un comportement d'évitement. En général, les effets quantiques sont déterminés par numération. [V. aussi *effet quantitatif* et *organisme d'essai*.]

*Effet quantitatif* – Dans un essai de pathogénicité et/ou de toxicité, effet dont la valeur mesurée varie continuellement sur une échelle numérique. Le nombre de jeunes produits ou la masse sèche des jeunes à la fin de l'essai sont des exemples d'effets quantitatifs. En général, les effets quantitatifs sont déterminés par des mesures. [V. aussi *effet quantique*.]

*Effet sublétal* – Effet nocif causé par une substance *pathogène* et/ou *toxique*, mais en deçà de la concentration qui cause directement la mort de l'organisme au cours de l'essai. [V. aussi *pathogénicité* et *toxicité*.]

*Endofaune* – Animaux qui fréquentent les sédiments déposés sur le fond d'une masse d'eau ou qui vivent à l'intérieur de ceux-ci.

*Éphippium* – Oothèque (coque) qui se forme sous la portion postéro-dorsale de la carapace d'une daphnie femelle adulte lorsque les conditions de culture ou d'essai lui sont défavorables. En général, les œufs que renferme l'éphippium ont été fécondés (en d'autres termes, la reproduction sexuée a déjà eu lieu).

*Épibenthique* – Qui vit sur les sédiments ou au-dessus des sédiments.

*Épicotyle* – Portion de l'embryon ou de la plantule d'une plante terrestre renfermant la pousse. D'un point de vue anatomique, l'épicotyle est délimité par la zone de transition qui le sépare de l'*hypocotyle*. [V. aussi *hypocotyle* et *levée*.]

*Essai* – Expérience menée en laboratoire dans des conditions et selon des procédures définies et contrôlées. Lorsqu'une seule expérience est en cause, ce terme est synonyme d'*étude*. [V. aussi *étude*.]

(*Essai avec*) *témoin chimique positif* – Essai faisant appel à des concentrations multiples d'un produit chimique toxique mené vers le même moment qu'un essai définitif sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une *substance d'essai*. Le *toxique de référence* utilisé est connu pour ses effets défavorables sur la survie, le comportement, la reproduction, la croissance ou tout autre *paramètre* biologique de l'*hôte* mesuré au moyen d'une *méthode d'essai biologique*, et ce, d'une manière prévisible et démontrable. [V. aussi *méthode d'essai*



*biologique, organisme d'essai, (organisme) hôte, paramètre, substance d'essai, témoin positif et toxique de référence.]*

*Essai de toxicité* – Essai permettant de déterminer l'effet toxique d'une *substance* sur un groupe d'organismes choisis (p. ex., plante ou animal terrestre ou aquatique), dans des conditions définies. Appliqué à l'environnement, l'essai permet habituellement de mesurer : a) la proportion d'*organismes d'essai* touchés (*effet quantique*); b) l'ampleur de l'effet observé (*effet quantitatif* ou gradué) après exposition à une ou plus d'une *substance d'essai* (p. ex., une *nouvelle substance microbienne*) ou à une ou plusieurs concentrations de la substance d'essai. Syn. : essai toxicologique. [V. aussi *effet quantique, effet quantitatif, létal, nouvelle substance microbienne, organisme d'essai, sublétalement, substance, substance d'essai* et *toxicité*.]

*(Essai en) microcosme* – Cadre expérimental établi dans un laboratoire et comportant un ou plusieurs milieux (p. ex., eau, sédiment, sol, végétation et couche de feuilles mortes) et divers groupes d'organismes sensibles que l'on trouve dans ces milieux (p. ex., espèces choisies de plantes et d'invertébrés aquatiques, de poissons, de plantes et d'invertébrés terrestres). Le cadre expérimental est conçu de façon à simuler physiquement une partie du milieu naturel. Lorsqu'un tel cadre est établi sur le terrain, on parle d'un essai en *mésocosme*.

*Essai toxicologique de référence* – Essai mené avec un *toxique de référence* parallèlement à un essai définitif conçu pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une *nouvelle substance microbienne*. Un essai toxicologique de référence permet d'évaluer la sensibilité des organismes ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus à l'égard du toxique de référence lors de l'évaluation de la nouvelle substance microbienne. Toute déviation par rapport à une plage normale préétablie indique que la sensibilité des *organismes d'essai* de même que le rendement et la précision de l'essai sont suspects. [V. aussi *nouvelle substance microbienne, organisme d'essai* et *toxique de référence*.]

*Estuarien* – Se dit d'un organisme ou d'une matière provenant d'une masse d'eau océanique côtière diluée d'une manière mesurable par l'eau douce provenant du lessivage des terres.

*Étiologie* – Étude ou théorie des causes des maladies, ou somme des connaissances sur ces causes. [V. aussi *maladie*.]

*Étude* – Expérience ou ensemble d'expériences au cours desquelles on examine en laboratoire une *substance d'essai* en vue d'obtenir, sur ses propriétés, des données destinées à être soumises aux autorités réglementaires compétentes. Lorsqu'une seule expérience est en cause, ce terme est synonyme d'*essai*. [V. aussi *essai* et *substance d'essai*.]

*Euryhalin* – Qui peut s'adapter à divers degrés de salinité d'un milieu.

*Euthanasie* – Procédé rapide et non douloureux de mise à mort d'un animal.

*Évaluation du risque* – Voir *évaluation du risque écologique*.

*Évaluation du risque écologique* – Identification et quantification des *risques* pour les organismes non humains, puis détermination de l'acceptabilité de ces risques.

*Expression environnementale* – Manière dont les micro-organismes réagissent à des variables environnementales (p. ex., température, pH et intensité lumineuse) dans des conditions de laboratoire contrôlées. Les essais sur l'expression environnementale permettent généralement de déterminer, pour chaque variable étudiée, les valeurs optimales et la gamme des valeurs ayant un effet sur la survie, la croissance et la répllication des micro-organismes.

*Fécondité* – Capacité d'engendrer une descendance.

*Fingerling* – Jeune salmonidé qui se nourrit activement; ce stade suit celui de l'alevin nageant.

*Gavage* – Introduction d'aliments dans l'estomac au moyen d'un tube.

*Germination* – Phénomènes physiologiques associés à la mobilisation des éléments nutritifs emmagasinés et au début de la croissance d'un organisme dormant, comme une spore (s'il s'agit d'une bactérie, d'un champignon ou d'une plante marine comme le varech, p. ex.) ou une graine (s'il s'agit d'une plante terrestre) d'embryon. Lorsque la radicule de la plantule sort du tégument, la germination prend fin et commence alors la croissance de la plantule. Chez les bactéries, les champignons et les levures, l'apparition de cellules végétatives au moment de la germination des spores constitue un phénomène semblable, mais moins complexe. [V. aussi *graine* et *plantule*.]

*Graine* – Propagule d'une plante dérivée d'un ovule. La graine est constituée d'un embryon et d'une enveloppe protectrice (le tégument) et peut contenir une substance de réserve (l'albumen).

*Hématopoïétique* – Relatif à la formation des cellules sanguines ou susceptible d'avoir un effet sur la formation de ces cellules.

*Hypocotyle* – Portion d'un embryon ou d'une plantule renfermant la radicule ou la racine. D'un point de vue anatomique, l'hypocotyle est délimité par la zone de transition qui le sépare de l'*épicotyle*. [V. aussi *épicotyle*.]

*Indigène* – Qualifie un micro-organisme qui existe naturellement dans l'écozone où il est destiné à être dispersé.

*Infectivité* – Capacité d'un micro-organisme de traverser ou de contourner les barrières naturelles de l'hôte contre l'infection. Ce terme décrit la capacité des micro-organismes d'échapper aux mécanismes de *clairance*, d'envahir un organisme, de s'y maintenir à l'état viable ou d'y proliférer, avec ou sans manifestation pathologique. [V. aussi *clairance* et *pathogénicité*.]

*Insectes* – Invertébrés de l'embranchement *Arthropoda* et de la classe *Insecta*. Les abeilles, cafards, coléoptères, collemboles, forficules (perce-oreille), fourmis, mouches, papillons, poissons d'argent, poux, pucerons, puces et termites, par exemple, sont des insectes. La plupart des insectes sont terrestres et respirent au moyen d'une trachée.

*Instillation nasale* – Injection par pulvérisation de particules colloïdales (p. ex., suspension liquide d'une *nouvelle substance microbienne*) directement dans les narines. [V. aussi *nouvelle substance microbienne*.]

*Instillation trachéale* – Injection par pulvérisation de particules colloïdales (p. ex., suspension liquide d'une *nouvelle substance microbienne*) directement dans la trachée. [V. aussi *nouvelle substance microbienne*.]

*Létal* – Qui cause directement la mort. La mort des organismes d'essai est définie par l'interruption de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité.

*Levée* – Terme désignant un processus vital; il est réservé ici aux plantes terrestres. La levée a lieu après la germination d'une plante et se traduit par l'apparition de l'*épicotyle* à la surface du sol au début de la croissance de la plantule. [V. aussi *épicotyle*.]

*Limite de la zone de confiance* – Limite, calculée logarithmiquement, située à plus ou moins deux écarts-types ( $\pm 2$  ET), de part et d'autre de la moyenne géométrique « historique » des paramètres (effets) mesurés au cours d'essais effectués avec un *toxique de référence*. [V. aussi (*essai avec*) *témoin chimique positif* et *toxique de référence*.]

*LIS* – Voir *Liste intérieure des substances*.

*Liste intérieure des substances (LIS)* – Compilation des substances déclarées au gouvernement du Canada conformément aux paragraphes 66(1) ou 105(1) de la LCPE 1999, ou qui ont été ajoutées à la LIS par suite de modifications apportées à celle-ci aux termes des paragraphes 87(1) et 112(1) ou de l'alinéa 87(5)a) de la LCPE 1999. La LIS indique quelles substances sont considérées comme existant sur le marché canadien. Une substance qui figure sur la LIS n'a pas à être déclarée avant son importation ou sa fabrication, à moins que les dispositions de la LIS concernant les nouvelles activités ne s'appliquent à cette substance ou que le déclarant ne propose d'utiliser la substance pour une *nouvelle activité*. [V. aussi *substance*.]

*Lot* – Quantité totale d'une *matière d'essai* (ou concentration spécifique correspondante) ou d'un *substrat d'essai* préparée pour chaque traitement (concentration) faisant partie d'un essai. Désigne toute substance ou concentration prête à être subdivisée aux fins des répétitions. [V. aussi *matière d'essai*.]

*Lux* – Unité d'éclairement mesurant l'intensité lumineuse par mètre carré. 1 lux = 0,092 9 pied-bougie et 1 pied-bougie = 10,76 lux. Aussi, 1 lux  $\approx$  0,015  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  et 1 klux  $\approx$  15  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ . Les conditions de luminosité ou l'irradiance sont exprimées en termes de flux quantique (débit de fluence photonique) dans la gamme de longueurs d'onde photosynthétiquement efficaces d'environ 400 à 700 nm. Le lien entre flux quantique et lux (ou pied-bougie) varie énormément en fonction de la source lumineuse, du photomètre utilisé, de la disposition géométrique et des réflexions possibles.

*Maladie* – Processus morbide s'accompagnant d'un ensemble caractéristique de symptômes, qui peut toucher soit des parties, soit le corps entier de l'organisme; son étiologie, sa pathologie et son évolution peuvent être connues ou inconnues. [V. aussi *pathologie*.]

*Marin* – Qui appartient à l'océan, à la mer ou au littoral, qui en vient ou qui s'y trouve. Une zone dite « marine » est caractérisée par l'absence de dilution appréciable de l'eau de mer par l'eau douce provenant du lessivage des terres.

*Matière d'essai* – Dans le contexte du présent guide, culture pure d'un *micro-organisme*, *consortium* (de *micro-organismes*), *mélange* de micro-organismes ou *produit microbien* auxquels des *organismes d'essai* (*hôtes*) sont exposés au cours d'une *étude* contrôlée. [V. aussi *consortium* (de *micro-organismes*), *essai*, *mélange* (de *micro-organismes*), *micro-organisme*, *nouvelle substance microbienne*, (*organisme*) *hôte* et *produit microbien*.]

*Mélange* (de *micro-organismes*) – Mélange renfermant deux cultures pures ou plus de micro-organismes. Conformément au *Règlement sur les RSN* pris en application de la LCPE 1999, un mélange de cultures pures de micro-organismes n'est pas considéré comme une *substance* distincte, mais bien comme un mélange de deux substances ou plus, dont chacune doit être déclarée séparément. Aux fins des essais, un mélange peut servir de *matière d'essai*. Cependant, le *déclarant* doit aussi tenir compte des caractéristiques connues des cultures pures du mélange; s'il soupçonne que des effets écologiques sont masqués, il doit envisager de tester séparément certaines des cultures pures (EC et SC, 2001). [V. aussi *consortium* (de *micro-organismes*), *déclarant*, *matière d'essai*, *nouvelle substance microbienne* et *substance*.]

*Mésocosme* – Voir *microcosme*.

*Mésophile* – Se dit d'un micro-organisme dont la croissance est optimale à des températures se situant entre  $\sim 20$  °C et 45 °C et qui tolère des températures minimales de  $\sim 15$ –20 °C. La plupart des micro-organismes sont mésophiles. [V. aussi *psychrophile*.]

*Méthode d'essai biologique* – Pratique normalisée ou protocole pour la conduite d'un essai, dans des conditions de laboratoire contrôlées, visant à évaluer et à mesurer l'effet ou les effets nocifs d'une *substance d'essai* (y compris une *nouvelle substance microbienne*) sur des plantes ou des animaux vivants d'une espèce particulière à un stade donné de son cycle biologique. Pour être classés comme une méthode d'essai

biologique, la pratique normalisée ou le protocole doivent avoir été publiés par un organisme de réglementation (p. ex., Environnement Canada ou USEPA) ou une autorité responsable de l'élaboration de lignes directrices en matière d'essais (p. ex., ASTM). Selon sa conception et le but visé, une méthode d'essai biologique peut constituer une méthode polyvalente (générale, d'application universelle) pouvant servir à des recherches ou à d'autres fins, comme la surveillance environnementale périodique, ou une *méthode de référence* normalisée (c.-à-d. un protocole d'essai rigoureux) utilisée dans un contexte réglementaire. [V. aussi *méthode de référence, nouvelle substance microbienne et substance d'essai.*]

*Méthode de référence* – Protocole conçu spécifiquement pour la mise en œuvre d'une méthode d'essai biologique dans un contexte réglementaire. Cette méthode comporte un ensemble explicite de procédures et de conditions d'essai exposé avec précision dans un document écrit et dont sont convenues formellement les parties en cause.

*Microbe* – *Micro-organisme*. [V. aussi *microbien et micro-organisme.*]

*Microbien* – Constitué de *micro-organismes*. [V. aussi *micro-organisme.*]

*Micro-organisme* – Organisme microscopique vivant qui : a) appartient à la famille des bactéries, des archéobactéries, des protistes, y compris les protozoaires et les algues, ou des champignons, y compris les levures; b) est un virus, une particule de type virus ou une particule sous-virale<sup>1</sup>; c) est une cellule cultivée d'un organisme non mentionné ci-dessus, à l'exclusion d'une cellule utilisée pour la multiplication de cet organisme; d) est une culture autre qu'une culture pure (Gouvernement du Canada, 1997). La définition donnée en d) désigne un *consortium*. [V. aussi *consortium (de micro-organismes) et organisme vivant.*]

*Mise en service* – Processus normalement mis en œuvre dans le but de vérifier que la conception d'un laboratoire satisfait aux codes et normes applicables et que la construction est conforme à l'intention sous-jacente aux plans et devis.

*Mode opératoire normalisé* – Procédures et conditions internes de laboratoire étayées par des documents qui décrivent la façon de mener un essai ou une activité en particulier et dont le détail ne figure pas, normalement, dans le plan de l'étude ou dans les lignes directrices pour les essais.

*Monocotylédones* – Dans la classification des plantes, espèces portant un seul *cotylédon*. [V. aussi *cotylédon et dicotylédones.*]

*Morbidité* – État maladif. [V. aussi *maladie.*]

*Nécrose* – Somme des changements morphologiques résultant de la mort cellulaire (exclut la mort cellulaire programmée, ou apoptose) causée par l'action progressive d'enzymes de dégradation. Ces changements peuvent toucher des groupes de cellules ou une partie d'un tissu ou d'un organe.

*Néonate* – Qui vient de naître ou d'éclore (p. ex., daphnie du premier âge, spécimen âgé de  $\leq 24$  h).

*Non contaminé* – Se dit d'un *substrat d'essai* (eau, sédiment ou sol) qui ne renferme aucune concentration de substance susceptible d'avoir des effets nocifs discernables sur les organismes soumis à un essai contrôlé de pathogénicité et/ou de toxicité. [V. aussi *substrat (d'essai).*]

*Nouvelle substance microbienne* – *Substance nouvelle* qui renferme un *micro-organisme* (naturel ou génétiquement modifié) ne figurant pas sur la *Liste intérieure des substances*. [V. *substance nouvelle.*]

---

<sup>1</sup> Même si, aux fins du *Règlement sur les RSN*, un virus est classé comme un micro-organisme, il est reconnu qu'il est, en réalité, une entité génétique subcellulaire infectieuse qui dépend totalement d'une ou de plusieurs cellules d'un hôte vivant pour se propager.

*Nullipare* – Qui n’a jamais engendré une descendance viable.

*Organisme* – Être vivant (animal ou plante).

*Organisme d’essai* – Dans le présent contexte, organisme exposé à une *matière d’essai* (c.-à-d. une *nouvelle substance microbienne* ou, dans certains cas, un *mélange* de micro-organismes ou un *produit microbien*) en vue de mesurer l’effet ou les effets de celle-ci dans des conditions de laboratoire contrôlées. [V. aussi *essai*, *matière d’essai*, *mélange (de micro-organismes)*, *micro-organisme*, *nouvelle substance microbienne*, *(organisme) hôte*, *produit microbien* et *substance*.]

*(Organisme) hôte* – Plante vivante ou animal vivant qui héberge un micro-organisme. Dans le présent contexte, un hôte est un organisme d’essai (c.-à-d. une espèce particulière de plante ou d’animal aquatique ou terrestre) que l’on expose à une *nouvelle substance microbienne* afin d’évaluer la capacité de cette dernière de causer des effets pathogènes et/ou toxiques dans des conditions de laboratoire contrôlées. [V. aussi *nouvelle substance microbienne*, *organisme* et *organisme d’essai*.]

*Organisme vivant* – Au sens du *Règlement sur les RSN* et de la *LCPE 1999*, désigne une *substance* biotechnologique animée. [V. aussi *substance*.]

*Oviducte* – Chez un mysidacé femelle, conduit dans lequel les œufs non fécondés se développent.

*Paramètre* – Mesure(s) ou valeur(s) caractérisant les résultats d’un essai. Dans un essai à concentration unique, il pourrait s’agir, par exemple, du pourcentage de survie, du pourcentage de réduction de la masse sèche à la fin de l’essai ou encore du pourcentage de diminution du nombre de jeunes produits. Dans un essai à concentrations multiples (ou, dans le cas d’oiseaux ou de petits mammifères, à doses multiples), la  $CL_{50}$ , la  $DL_{50}$ , la  $CE_{50}$ , la  $DE_{50}$ , la  $CI_p$  (p. ex.,  $CI_{50}$  ou  $CI_{25}$ ) ou la  $DI_p$  (p. ex.,  $DI_{50}$  ou  $DI_{25}$ ) peuvent constituer des paramètres. La réaction des organismes d’essai (p. ex., mortalité, nombre de jeunes produits, croissance, histopathologies) constitue également un paramètre.

*Pathogène* (adj.) – Se dit d’un *micro-organisme* qui peut provoquer une maladie ou des symptômes morbides. [V. aussi *morbidité* et *pathogénicité*.]

*Pathogène* (nom) – *Micro-organisme* capable de causer une maladie.

*Pathogène de référence* – *Micro-organisme* infectieux étalon servant de *témoin microbien positif* dans un essai portant sur une *nouvelle substance microbienne*. Il permet de s’assurer que les *organismes d’essai* réagissent à un micro-organisme *pathogène* connu et que les méthodes d’essai connexes conviennent. [V. aussi *micro-organisme*, *nouvelle substance microbienne*, *organisme d’essai*, *pathogène* et *témoin microbien positif*.]

*Pathogénicité* – Capacité d’un *micro-organisme* d’infecter un *hôte* (p. ex., un *organisme d’essai*), de s’y établir et de s’y multiplier, puis d’infliger des lésions ou des dommages susceptibles ou non de mener à la mort. L’effet sur l’hôte, qui peut être sublétalement ou létalement, dépend de la *virulence* du pathogène (c.-à-d. le micro-organisme), de même que de la résistance ou de la sensibilité de l’hôte. [V. aussi *(organisme) hôte*, *pathogène* et *virulence*.]

*Pathologie* – Science consacrée à l’étude des maladies; désigne également les symptômes d’une maladie. Cette science s’intéresse aux changements structuraux et fonctionnels des tissus et des organes, qui sont à l’origine d’une maladie ou qui en sont la cause.

*PC* ou *préparation commerciale* – *Produit microbien* de formulation commerciale qui renferme un *micro-organisme* et d’autres ingrédients (p. ex., agents anti-UV, agents de mise en suspension, porteurs, substances d’enrobage, mouillants). L’USEPA (1996a-nn) et l’ARLA (2001) utilisent ce terme, qui est synonyme de

*produit microbien*, pour désigner un produit renfermant un *AAM*. Le mode d'emploi de la préparation commerciale devrait être indiqué sur l'étiquette. [V. aussi *AAM*, *micro-organisme* et *produit microbien*.]

*Pélagique* – Dans le présent contexte, se dit d'un organisme aquatique qui nage ou qui flotte librement.

*pH* – Logarithme négatif de l'activité des ions hydrogène exprimée en équivalents grammes par litre. La valeur du pH indique le degré ou l'intensité des réactions tant acides qu'alcalines sur une échelle de 0 à 14, le nombre 7 représentant la neutralité, les nombres inférieurs à 7, des réactions de plus en plus acides, et les nombres supérieurs à 7, des réactions de plus en plus alcalines.

*Photopériode* – Durée de l'éclairement (et de l'obscurité) sur 24 h.

*Phytophile* – Dans le présent contexte, se dit des insectes qui vivent dans la végétation ou aux dépens de celle-ci.

*Plantule* – Jeune plante (sexuellement immature) issue d'une graine plutôt que d'une bouture. [V. aussi *graine*.]

*Poche à couvée* – Chez un mysidacé femelle, poche épithéliale reliée aux oviductes dans laquelle les embryons se développent. [V. aussi *oviducte*.]

*Pousse* – Portion aérienne d'une plante, constituée d'une tige, de pédoncules et de feuilles, de même que de tout organe reproducteur qui peut y être attaché.

*Précision* – Degré de similarité des données recueillies au cours de mesures répétées de la même variable métrique. La précision décrit le degré de certitude entourant un résultat ou le rapprochement des valeurs d'un paramètre dérivées d'une analyse statistique, comme la  $CI_p$  ou la  $DI_p$ .

*Préparation commerciale* – Voir *PC*.

*(Processus) immunologiques* – Expression de mécanismes acquis (adaptatifs) et/ou innés (constitutifs) du système immunitaire des vertébrés supérieurs (mammifères surtout) en réaction à une exposition à une ou des substances étrangères. L'immunité acquise (adaptative ou clonale) est une réaction donnée de défense à médiation cellulaire qui élimine une ou des substances antigéniques introduites dans l'organisme par suite d'une exposition. L'immunité innée inclut des éléments non spécifiques de *clairance*, dont ceux associés à l'inflammation et aux barrières muqueuses. [V. aussi *clairance*.]

*Produit microbien* – Préparation commerciale renfermant un ou plus d'un *micro-organisme*. La préparation peut aussi contenir une ou plusieurs *substances* inorganiques et/ou organiques inanimées (p. ex., agents anti-UV, agents de mise en suspension, porteurs, substances d'enrobage, mouillants). [V. aussi *microbien*, *micro-organisme*, *préparation commerciale* et *substance*.]

*(Programme d')assurance de la qualité* – Système précis, englobant le personnel correspondant, mis en place dans un laboratoire d'essai, qui est indépendant de la conduite de l'étude et qui vise à donner à la direction et à d'autres intéressés l'assurance que les Principes de bonnes pratiques de laboratoire sont respectés.

*Protocole* – Document exposant avec précision l'ensemble des marches à suivre pendant un essai ou une expérience et dont sont convenues formellement les parties en cause.

*Psychrophile* – Se dit d'un *micro-organisme* dont la croissance est optimale à des températures ne dépassant pas ~15 °C. Ce terme signifie « qui aime le froid ». [V. aussi *mésophile*.]

*Racine* – Partie d'une plante vasculaire qui croît habituellement vers le bas, dans le sol ou un autre substrat, maintient la plante en place et absorbe l'eau et les éléments nutritifs dont celle-ci a besoin.

*Répétition* – Entité identique (p. ex., groupe, enceinte expérimentale ou traitement de répétition). [V. aussi *traitement (d'essai)* et *traitement de répétition*.]

*Responsable principal des essais* – Personne qui exerce, au nom du directeur de l'étude, des responsabilités bien définies pour les phases de l'étude qui lui sont déléguées. Le directeur de l'étude ne peut lui déléguer sa responsabilité de la conduite générale de l'étude. [V. aussi *directeur de l'étude*.]

*Risque* – Probabilité ou vraisemblance d'un effet nocif.

*Salinité* – Quantité totale (grammes) de sels marins dissoute dans 1 L d'eau (de mer), généralement exprimée en parties pour mille (‰). Elle est déterminée une fois que tous les carbonates ont été convertis en oxydes, que le bromure et l'iodure ont été remplacés entièrement par du chlorure et que toute la matière organique a été oxydée. On peut également mesurer la salinité directement à l'aide d'un salinomètre, d'un conductivimètre ou d'autres moyens.

*Sans renouvellement* – Se dit d'un essai sur des plantes ou des animaux aquatiques pendant lequel les concentrations expérimentales ne sont pas renouvelées.

*Sédiment* – Matière particulaire naturelle qui, après son transport dans l'eau, se dépose au fond de l'eau. Ce terme peut également désigner un substrat préparé artificiellement à partir de matières particulières choisies (p. ex., sable d'une granularité donnée ou bentonite) et dans lequel les organismes benthiques soumis à un essai peuvent s'enfouir.

*Sédiment d'essai* – Échantillon ou sous-échantillon de sédiment entier *non contaminé* utilisé comme *substrat d'essai* au cours d'un essai de laboratoire conçu pour mesurer les effets *pathogènes* et/ou *toxiques* d'une *nouvelle substance microbienne*. Il peut être prélevé dans un endroit non contaminé du milieu naturel ou être préparé en laboratoire à partir de composants naturels (sable, limon et/ou particules colloïdales non contaminés) dans des proportions définies. Dans certains cas, *sédiment d'essai* désigne également un sédiment préparé pour ou dans des enceintes expérimentales, y compris un échantillon ou sous-échantillon de sédiment témoin négatif, de sédiment de référence ou de tout traitement renfermant une concentration donnée de *matière d'essai*. [V. aussi *matière d'essai, non contaminé, nouvelle substance microbienne* et *substrat (d'essai)*.]

*Série (d'essais)* – Combinaison de plusieurs essais en vue de mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une *nouvelle substance microbienne*, normalement sur différents organismes d'essai (hôtes) représentant diverses catégories d'organismes présents dans le milieu naturel aquatique ou terrestre (p. ex., plantes, invertébrés et vertébrés aquatiques ou terrestres). [V. aussi *nouvelle substance microbienne*.]

*Sol* – Matière entière et intacte représentative du milieu terrestre, manipulée le moins possible après son prélèvement ou sa préparation. Dans la nature, le sol est formé par l'altération physique, chimique et biologique et la désintégration des roches, et par la décomposition et le recyclage des éléments nutritifs de la matière organique provenant des plantes et des animaux. Les activités des micro-organismes, des invertébrés et des plantes qu'il contient, de même que les activités anthropiques, influent sur ses caractéristiques physicochimiques.

*Sol d'essai* – Échantillon de sol entier *non contaminé* utilisé comme *substrat d'essai* au cours d'un essai de laboratoire conçu pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une *nouvelle substance microbienne*. Il peut être prélevé dans un endroit non contaminé du milieu naturel ou être préparé (simulé) en laboratoire à partir de composants naturels (sable, limon, particules colloïdales et tourbe non contaminés) dans des proportions définies. Dans certains cas, *sol d'essai* désigne également un sol préparé pour ou dans des enceintes expérimentales, y compris un échantillon ou sous-échantillon de sol témoin négatif, de sol de référence ou de tout traitement renfermant une concentration donnée de *matière d'essai*. [V. aussi *matière d'essai, non contaminé, nouvelle substance microbienne* et *substrat (d'essai)*.]

*Solution saline isotonique* – Solution saline préparée en laboratoire, qui présente la même teneur en solutés que le sang d'une espèce donnée utilisée comme organisme d'essai.

*Sous-lot* – Portion d'un *lot* particulier d'un *produit microbien* ou d'une *nouvelle substance microbienne* non préparée; cette portion est identifiée par un code ou un numéro. [V. aussi *lot, microbien, nouvelle substance microbienne, produit microbien* et *substance*.]

*Sténohalin* – Qui ne peut tolérer une grande variation de la salinité ambiante.

*Subléthal* – Qui est nocif pour l'organisme, mais en deçà de la concentration qui cause directement la mort au cours de l'essai.

*Substance* – Toute matière organique ou inorganique, animée ou inanimée, distinguable. Cette définition inclut : a) une culture pure d'un *micro-organisme*; b) un *consortium*. Un *mélange de micro-organismes*, ou *produit microbien*, constitue un mélange de substances plutôt qu'une substance distincte. [V. aussi *consortium (de micro-organismes), mélange (de micro-organismes), micro-organisme, nouvelle substance microbienne* et *produit microbien*.]

*Substance d'essai* – Substance animée ou inanimée étudiée dans des conditions de laboratoire contrôlées afin de mesurer ses effets pathogènes et/ou toxiques. [V. aussi *essai, matière d'essai, nouvelle substance microbienne, pathogène, substance* et *toxique*.]

*Substance nouvelle* – Substance non inscrite sur la *Liste intérieure des substances*. [V. aussi *nouvelle substance microbienne* et *substance*.]

*(Substance) toxique* – Toute substance qui pénètre ou peut pénétrer dans l'environnement en une quantité ou concentration ou dans des conditions de nature à : a) avoir, immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou sur la diversité biologique; b) mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie; c) constituer un danger au Canada pour la vie ou la santé humaines. [Article 64 de la LCPE 1999.]

*Substrat (d'essai)* – Substrat naturel (p. ex., eau, sédiment ou sol) utilisé au cours d'un essai sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une *nouvelle substance microbienne*, une fois ce substrat homogénéisé en un *lot* et subdivisé en *répétitions*. Pour un *traitement d'essai*, on mélange avec un *substrat d'essai* une concentration donnée de la matière d'essai. Dans un essai de laboratoire au cours duquel une matière d'essai est mélangée aux aliments destinés aux organismes d'essai, ces aliments sont également considérés comme un *substrat d'essai*. [V. aussi *lot, matière d'essai, nouvelle substance microbienne, répétition* et *traitement (d'essai)*.]

*Témoin* – Dans une enquête ou une étude, variante expérimentale reproduisant toutes les conditions et tous les facteurs qui pourraient influencer sur les résultats, sauf la condition particulière étudiée. Dans un essai de pathogénicité et/ou de toxicité, le témoin doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, mais ne pas renfermer la *substance d'essai*. Le témoin sert à vérifier l'absence de pathogénicité ou de toxicité attribuable aux conditions de base de l'essai, par exemple, la température, la santé des organismes d'essai ou les effets de la manipulation de ces derniers. Le terme *témoin* est synonyme de *témoin négatif*, à moins d'indication contraire. **Nota** : Dans bon nombre de sources citées dans le présent document, le terme « contrôle » est fréquemment employé à la place de « témoin », mais c'est ce dernier terme qui a été retenu ici. [V. aussi (*essai avec*) *témoin chimique positif, substance d'essai, témoin microbien positif, témoin négatif, témoin non infectieux, témoin positif* et *témoin sur filtrat stérile*.]

*Témoin inactif* – Voir *témoin non infectieux*.

*Témoin inactivé* – Voir *témoin non infectieux*.



*Témoin microbien positif* – *Traitement* qui renferme un *pathogène* connu pour ses effets défavorables sur la survie, le comportement, la reproduction, la croissance ou tout autre *paramètre* biologique de l'*(organisme) hôte* mesuré au moyen d'une *méthode d'essai biologique*, et ce, d'une manière prévisible et démontrable. Un témoin microbien positif utilisé dans un essai comportant une *nouvelle substance microbienne* consiste en une seule concentration d'un *pathogène* autre que le *micro-organisme* (c.-à-d. la *nouvelle substance microbienne*) à l'étude, *pathogène* dont on sait qu'il aura des effets défavorables et prévisibles sur les organismes d'essai. [V. aussi *méthode d'essai biologique, micro-organisme, nouvelle substance microbienne, organisme d'essai, (organisme) hôte, paramètre, pathogène, témoin positif et traitement (d'essai).*]

*Témoin négatif* – Dans un essai, *traitement* exempt de la *substance d'essai* qui pourrait avoir un effet défavorable sur la survie, le comportement, la reproduction, la croissance ou tout autre *paramètre* biologique mesuré au moyen d'une *méthode d'essai biologique* donnée. Tout essai doit comporter un tel traitement, lequel sert à vérifier l'absence de pathogénicité et/ou de toxicité attribuables aux conditions de base de l'essai, par exemple, la température, la santé des organismes d'essai ou les effets de la manipulation de ces derniers. Pour que les résultats d'un essai soient considérés comme probants et acceptables, le témoin négatif doit satisfaire aux critères de validité propres à l'essai. [V. aussi *méthode d'essai biologique, paramètre, substance, témoin et traitement (d'essai).*]

*Témoin non infectieux* – *Traitement* témoin dans lequel la *matière d'essai* à sa CDM a été traitée auparavant (p. ex., par voie thermique) en vue d'inactiver les micro-organismes viables qu'elle renferme, tout en préservant leur intégrité structurale. Ce témoin permet de déterminer si la CDM atténuée (non infectieuse) (ou, dans le cas d'essais sur des oiseaux ou de petits mammifères, la DDM) peut avoir un ou des effets nocifs sur les organismes d'essai une fois supprimée sa capacité de causer une infection et, par la suite, d'avoir des effets pathogènes. Syn. : *témoin inactif, témoin inactivé et témoin non viable*. [V. aussi *CDM, matière d'essai et traitement (d'essai).*]

*Témoin non viable* – Voir *témoin non infectieux*.

*Témoin positif* – *Traitement* (ou, dans le cas d'un *témoin chimique positif*, série de traitements) qui renferme une *substance d'essai* connue pour ses effets défavorables sur la survie, le comportement, la reproduction, la croissance ou tout autre *paramètre* biologique de l'*hôte* mesuré au moyen d'une *méthode d'essai biologique*, et ce, d'une manière prévisible et démontrable. [V. aussi (*essai avec*) *témoin chimique positif, méthode d'essai biologique, nouvelle substance microbienne, organisme d'essai, (organisme) hôte, paramètre, substance d'essai, témoin microbien positif, toxique de référence et traitement (d'essai).*]

*Témoin sur filtrat stérile* – *Traitement* témoin inclus dans un essai, qui consiste en un filtrat stérile préparé à partir de la *matière d'essai* (p. ex., une *nouvelle substance microbienne*) en suspension à sa CDM. Ce témoin permet de déterminer si le filtrat stérilisé de la CDM (ou, dans le cas d'essais sur des oiseaux ou de petits mammifères, de la DDM) peut avoir un ou des effets nocifs sur les organismes d'essai. [V. aussi *CDM, matière d'essai, nouvelle substance microbienne, témoin et traitement (d'essai).*]

*Teneur* – Voir *concentration*.

*Thalle* – Structure foliacée individuelle de la lenticule mineure (ou petite lentille d'eau). C'est la plus petite unité capable de se reproduire.

*Toxicité* – Capacité d'une *substance d'essai* de provoquer, en raison de sa nature toxique, des effets nocifs tant létaux que sublétaux chez des plantes ou des animaux vivants. Dans le cas d'un essai portant sur une *nouvelle substance microbienne*, la toxicité peut être associée à la production de *toxines* par le micro-organisme et/ou à ses métabolites ou à ses composantes structurales (p. ex., parois cellulaires s'il s'agit d'une bactérie). Dans un essai faisant appel à un *produit microbien*, elle peut être associée à une ou des substances dissoutes ou particulières (p. ex., milieu de culture de porteurs et/ou support « inerte ») présentes dans ce produit, de même

qu'aux micro-organismes qu'il renferme. [V. aussi *léta*, *nouvelle substance microbienne*, *produit microbien*, *subléta*, *substance d'essai* et *toxine*.]

*Toxicité aiguë* – Manifestation, chez l'organisme d'essai, d'un effet nocif (léta ou subléta) peu de temps (minutes, heures ou quelques jours) après l'exposition à une *substance d'essai*. [V. aussi *substance d'essai*.]

*Toxicité chronique* – Effets nocifs discernables à long terme, reliés à des modifications de paramètres biologiques comme la reproduction, la croissance, le métabolisme ou la capacité de survivre. Ces effets sont mesurés chez des groupes d'organismes d'essai exposés à une *substance toxique*. L'exposition peut être *aiguë* ou *chronique*; les paramètres biologiques sont mesurés pendant l'essai à long terme et/ou à la fin de celui-ci. [V. aussi *aigu*, *chronique*, *substance* et *toxique*.]

*Toxicologie* – Science qui étudie la *toxicité* des *substances* ou des conditions toxiques. Cette science fait appel à une gamme illimitée de disciplines scientifiques, d'outils de laboratoire ou de terrain, d'études à divers niveaux allant de la molécule à l'écosystème. La toxicologie appliquée se propose normalement de définir la marge de sécurité de l'emploi de substances chimiques ou d'autres agents, y compris les *nouvelles substances microbiennes*, en se fondant sur les *toxiques* qu'ils renferment. [V. aussi *écotoxicologie*, *nouvelle substance microbienne*, *substance*, *toxicité* et *toxique*.]

*Toxine* – Substance élaborée par un micro-organisme et qui est susceptible d'avoir un effet nocif sur un *organisme d'essai* (hôte), indépendamment de la présence du micro-organisme vivant.

*Toxinogénicité* – Capacité d'un micro-organisme d'élaborer une *toxine*. [V. aussi *toxine*.]

*Toxique* – Syn. de *substance toxique*.

*Toxique de référence* – Étalon chimique permettant d'établir la fiabilité des données sur la toxicité d'une *substance d'essai*. Dans la plupart des cas, on procède à un essai de toxicité au moyen d'un toxique de référence afin d'évaluer la sensibilité des organismes au moment où l'on évalue la substance d'essai ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus à l'égard de cette substance. [V. aussi (*essai avec*) *témoin chimique positif*, *organisme d'essai* et *substance d'essai* .]

*Traitement (d'essai)* – Concentration donnée, dans un *substrat d'essai*, d'une *substance d'essai* à laquelle sont exposés des groupes de *répétition* des *organismes d'essai*; ce traitement est préparé en laboratoire. Chaque ensemble de groupes *témoins* (p. ex., *témoins négatifs*, *témoins non infectieux* positifs, *témoins sur filtrat stérile*) faisant partie d'un essai de pathogénicité et/ou de toxicité représente un *traitement* distinct. [V. aussi *organisme d'essai*, *répétition*, *substance d'essai*, *substrat (d'essai)*, *témoin non infectieux*, *témoin sur filtrat stérile* et *traitement de répétition*.]

*Traitement de répétition* – Enceinte expérimentale individuelle renfermant un nombre identique d'*organismes d'essai* (hôtes) issus d'un même groupe (population) d'une ou de plusieurs enceintes de culture ou de rétention, ainsi qu'une concentration de la même *substance d'essai* et une quantité mesurée du ou des substrats d'essai qui sont identiques à celles des autres enceintes faisant partie du traitement. Comme il s'agit d'une unité expérimentale indépendante, tout transfert d'organisme, de substance ou de substrat d'une enceinte à l'autre invalide l'analyse statistique fondée sur la répétition. [V. aussi *répétition*, *substance d'essai* et *traitement (d'essai)*.]

*Unité (microbienne)* – Entité vivante distincte présente dans une *nouvelle substance microbienne*. On se sert de cette unité pour calculer et mesurer la CDM (ou, dans le cas d'essais menés sur des oiseaux ou de petits mammifères, la DDM) et d'autres concentrations (doses) de micro-organismes auxquels les organismes hôtes sont exposés lors d'essais de pathogénicité et/ou de toxicité menés en laboratoire. Voir la sous-section 3.3.1 pour une définition plus détaillée. [V. aussi *CDM*, *microbien* et *nouvelle substance microbienne*.]

*Virion* – Particule virale complète qui comporte un acide nucléique (ARN ou ADN) et une enveloppe protéinique et qui constitue la forme infectieuse d'un virus.

*Virulence* – Degré de *pathogénicité* d'un *micro-organisme* que révèlent ses effets *sublétaux* et/ou *létaux* sur un organisme *hôte* ou sa capacité d'envahir les tissus de ce dernier. Dans le contexte du présent guide, la virulence d'un micro-organisme est mesurée dans des conditions de laboratoire contrôlées au moyen d'une série d'essais à concentrations multiples sur divers organismes hôtes. Elle est établie et exprimée sous forme de paramètre statistique, comme la  $CL_{50}$ , la  $CI_p$  et/ou la CMEO/CSEO (ou, s'il s'agit d'oiseaux ou de petits mammifères, la  $DL_{50}$ , la  $DI_p$  et/ou la DMEO/DSEO). [V. aussi  $CI_p$ ,  $CL_{50}$ , CMEO, CSEO,  $DI_p$ ,  $DL_{50}$ , DMEO, DSEO, *létaux*, *micro-organisme*, (*organisme*) *hôte*, *pathogénicité* et *sublétaux*.]

## Remerciements

---

Le présent guide a été rédigé par D. McLeay [McLeay Environmental Ltd., Victoria (C.-B.)], F. Genthner [USEPA, Gulf Breeze (FL)], R. James [US Department of Agriculture, Logan (UT)], G. Lazarovits [Agriculture et Agroalimentaire Canada, London (Ont.)] et D. Percy [Collège de médecine vétérinaire de l'Ontario, Guelph (Ont.)]. M. Bombardier et R. Scroggins [Division des méthodes biologiques, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa (Ont.)] ont agi comme autorité scientifique et directeur technique, respectivement; ils ont aussi apporté une aide technique et orienté les travaux. Les auteurs ont bénéficié des conseils et de l'aide techniques de K. Hibbeln, H. Darch et T. Paré, Division de la biotechnologie, Direction des substances nouvelles, Environnement Canada, Gatineau (Qué.), de même que de L. Novak (Stantec Consulting Ltd., Guelph (Ont.)). Nous sommes reconnaissants du soutien financier fourni par la Direction des substances nouvelles d'Environnement Canada [Gatineau (Qué.)] à McLeay Environmental Ltd. [Victoria (C.-B.)] pour l'élaboration du présent guide.

Nous remercions les membres suivants du comité consultatif scientifique d'Environnement Canada, qui étaient responsables de l'examen des versions initiale et finale du rapport et qui ont formulé de nombreuses observations judicieuses : J. Beardall [Direction des substances nouvelles, Environnement Canada, Gatineau (Qué.)]; B. Belliveau [Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Santé Canada, Ottawa (Ont.)]; M. Bombardier [Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa (Ont.)]; K. Doe (Centre des sciences de l'environnement, Région de l'Atlantique, Environnement Canada, Moncton (N.-B.)); K. Hibbeln [Direction des substances nouvelles, Environnement Canada, Gatineau (Qué.)]; S. Holmes [Centre de foresterie des Grands Lacs, Ressources naturelles Canada, Sault Ste. Marie (Ont.)]; D. Kreuzweiser [Centre de foresterie des Grands Lacs, Ressources naturelles Canada, Sault Ste. Marie (Ont.)]; J. Louter [Direction des substances nouvelles, Environnement Canada, Gatineau (Qué.)]; L. Novak [Stantec Consulting Ltd., Guelph (Ont.)]; D. Palmer [Wildlife International, Easton (MD)]; A. Putt [Springborn Smithers Laboratories, Wareham (MA)]; R. Scroggins [Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa (Ont.)]; V. Seligy [Centre de l'hygiène du milieu, Santé Canada, Ottawa (Ont.)]; R. Sherwood [IIT Research Institute, Chicago (IL)]; Z. Vaituzis [Microbial Pesticides Branch, USEPA, Washington (DC)]; S. Ward [ABC Laboratories, Columbia (OH)]; H. Yu [Section de la biotechnologie, Santé Canada, Ottawa (Ont.)]. On trouvera à l'annexe C les coordonnées de chaque membre du comité consultatif scientifique.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent aux personnes suivantes, qui nous ont conseillés et soutenus au cours de l'établissement du présent guide : A. Fairbrother [Ecosystem Characterization Branch, USEPA, Corvallis (OR)]; D. MacGregor (Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa (Ont.)); W. Schneider [Biopesticides and Pollution Prevention Division, USEPA, Washington (DC)]; H. Thompson (Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, Royaume-Uni).

Nous exprimons notre reconnaissance aux personnes suivantes, qui ont examiné et fourni des données inédites sur l'utilisation et le rendement de diverses lignes directrices de l'USEPA intitulées *Series 885* ou de modes opératoires normalisés connexes servant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'AAM : Z. Vaituzis [Microbial Pesticides Branch, Biopesticides and Pollution Prevention Division, USEPA, Washington (DC)]; D. Palmer [Wildlife International Ltd., Easton (MA)]; A. Putt [Springborn Smithers Laboratories Inc., Wareham (MA)]; S. Ward [ABC Laboratories, Columbia (MO)]. Nous remercions ABC Laboratories, Springborn Smithers Laboratories et Wildlife International qui ont partagé leurs modes opératoires normalisés pour ces essais et qui ont formulé des observations au sujet du présent guide.

Outre les membres du comité consultatif scientifique qui ont examiné le rapport, les personnes suivantes ont revu la version finale du document et fourni des commentaires précieux : G. Arvanitakis [Section de la biotechnologie, Bureau de l'évaluation et du contrôle des substances nouvelles, Santé Canada, Ottawa (Ont.)]; H. Bergmans (Bureau des OGM, Institut de la santé publique et de l'environnement, Pays-Bas); H. Darch [Direction des substances nouvelles, Environnement Canada, Gatineau (Qué.)]; T. Paré [Direction des substances nouvelles, Environnement Canada, Gatineau (Qué.)]; J. Princz [Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (Ont.)].

## Introduction

### 1.1 Contexte

#### 1.1.1 Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)

La *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)* (LCPE 1999) a été promulguée en 1988 et modifiée en 1999<sup>2</sup>. Depuis l'entrée en vigueur du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles*<sup>3</sup> (RSN) (Gouvernement du Canada, 1997) pris en application de la LCPE 1999, les ministres de l'Environnement et de la Santé sont tenus d'évaluer les renseignements contenus dans les déclarations exigées des entreprises ou des particuliers qui veulent importer ou fabriquer une *substance nouvelle* au Canada. Dans le cadre de ce processus, les responsables des Programmes des substances nouvelles d'Environnement Canada (EC) et de Santé Canada (SC) évaluent ces renseignements afin de déterminer les éventuels *effets* nocifs de la substance pour le milieu aquatique et/ou terrestre. Conformément à la LCPE 1999, cette évaluation peut donner lieu aux mesures suivantes : (i) aucune restriction relative à l'importation et/ou à la fabrication de la substance ou (ii) imposition de conditions ou interdiction de fabrication et/ou d'importation de la substance, ce qui pourrait inclure : a) l'obligation, pour le déclarant, de fournir les renseignements complémentaires que les deux Ministères jugent nécessaires ou b) des restrictions quant aux utilisations de la substance.

#### 1.1.2 Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles

En vertu de la LCPE 1999, les données relatives aux effets nocifs sur l'environnement sont systématiquement prises en compte dans l'*évaluation du risque écologique des substances nouvelles* déclarées avant leur rejet dans l'environnement

<sup>2</sup> Cette loi est accessible sur Internet à l'adresse <http://lois.justice.gc.ca/fr/C-15.31/>, de même qu'à partir de l'adresse <http://www.ec.gc.ca/substances/>.

<sup>3</sup> Ce règlement est accessible sur Internet à l'adresse <http://lois.justice.gc.ca/fr/C-15.31/> : choisir « Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles » sous « Règlements apparentés ». On peut aussi le consulter à partir de l'adresse <http://www.ec.gc.ca/substances/>.

(conformément à l'annexe XV du *Règlement sur les RSN*). Le *Règlement sur les RSN*, qui visait alors les substances chimiques et les polymères, est entré en vigueur au Canada le 1<sup>er</sup> juillet 1994. Depuis le 1<sup>er</sup> septembre 1997, la partie II.1 du *Règlement* prévoit la déclaration des substances nouvelles qui sont des organismes, y compris les *micro-organismes* (Gouvernement du Canada, 1997)<sup>4</sup>. Santé Canada évalue les nouveaux organismes vivants afin de déterminer s'ils peuvent avoir des effets sur la santé humaine, tandis que les évaluations d'Environnement Canada ont trait aux effets éventuels de ces organismes sur l'environnement. Les ministres de l'Environnement et de la Santé examinent les renseignements exigés des *déclarants*, de même que les autres informations dont ils disposent sur les organismes vivants, afin de déterminer si ces derniers sont « toxiques aux termes de la LCPE 1999 » ou susceptibles de le devenir.

#### 1.1.3 Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : organismes

En 2001, Environnement Canada et Santé Canada ont révisé le document intitulé *Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : organismes*<sup>5</sup> (EC et SC, 2001) afin de tenir compte des changements apportés à la LCPE 1999. Ces directives permettent aux déclarants qui veulent importer ou fabriquer un nouvel organisme vivant de comprendre et d'assumer les responsabilités que leur confère le *Règlement sur les RSN*. Ainsi, ils doivent présenter un formulaire de déclaration renfermant les renseignements prescrits avant d'importer ou de fabriquer des micro-organismes<sup>6</sup> — naturels ou génétiquement modifiés — qui ne figurent pas sur la *Liste intérieure des substances* (LIS). Ces micro-

<sup>4</sup> La partie II.1 du *Règlement sur les RSN* (Gouvernement du Canada, 1997) a été modifiée le 31 mars 2000 afin de tenir compte des changements apportés à la LCPE 1999.

<sup>5</sup> Ce document peut être consulté sur Internet à l'adresse <http://www.ec.gc.ca> : choisir « Le Registre environnemental de la LCPE » puis « Lignes directrices/Codes de pratique », et cliquer sur le titre. On trouvera à partir de l'adresse <http://www.ec.gc.ca/substances/> d'autres lignes directrices et informations sur les substances nouvelles.

<sup>6</sup> Nota : La définition de *micro-organisme* donnée ici et dans le *Règlement sur les RSN* inclut les *consortiums*.

organismes sont considérés comme des *substances nouvelles*, et les Directives précitées renferment une description générale des renseignements que doit fournir le déclarant.

#### **1.1.4 Substances microbiennes visées par le Règlement sur les RSN**

Le *Règlement sur les RSN* s'applique aux *substances microbiennes* non inscrites sur la LIS et que l'on prévoit d'importer ou de fabriquer au Canada. Il ne s'applique pas à celles qui satisfont aux critères d'exemption relatifs aux activités de recherche et de développement ou qui sont fabriquées ou importées en vue d'une utilisation réglementée aux termes des lois et règlements mentionnés à l'annexe 4 de la LCPE 1999. Pour éviter le chevauchement inutile de règlements, l'annexe 4 de la LCPE 1999 donne la liste des autres lois et règlements fédéraux qui exigent un préavis d'importation, de fabrication ou de vente, de même qu'une évaluation préalable de la *toxicité* et/ou de la *pathogénicité* des substances visées. À l'heure actuelle, les lois et règlements qui sont mentionnés à l'annexe 4 régissent les micro-organismes présents dans les produits suivants :

- pesticides visés par la *Loi sur les produits antiparasitaires* et le *Règlement sur les produits antiparasitaires*;
- aliments du bétail visés par la *Loi relative aux aliments du bétail* et son règlement d'application;
- suppléments (comme les inoculats) visés par la *Loi sur les engrais* et son règlement d'application;
- produits vétérinaires biologiques visés par la *Loi sur la santé des animaux* et le *Règlement sur la santé des animaux*.

Toutes les autres utilisations de micro-organismes sont régies par la LCPE 1999 et le *Règlement sur les RSN*. Voici des exemples d'applications et de produits qui mettent en cause des micro-organismes et qui peuvent être visés par le *Règlement sur les RSN* :

- a) biorestoration/bioaugmentation de sols, d'eau ou d'autres matières contaminés;
- b) procédés de désulfuration associés à l'exploitation minière et à l'extraction de métaux;

- c) systèmes de traitement des effluents, y compris les biofiltres;
- d) récupération assistée des hydrocarbures;
- e) dégradation des protéines ou des graisses, comme les intercepteurs de graisse utilisés dans les restaurants;
- f) activateurs pour fosses septiques;
- g) traitement du lisier;
- h) activateurs de compost;
- i) produits de nettoyage;
- j) production de bioproduits : enzymes, protéines, acides aminés, vitamines ou biocarburants/bioénergie;
- k) produits de clarification de l'eau, d'étangs ou de mares-réservoirs.

#### **1.1.5 Le présent guide**

Dans le cadre du processus d'évaluation prévu dans le *Règlement sur les RSN*, il faut recueillir de l'information afin de déterminer si une *nouvelle substance microbienne* est susceptible d'avoir des effets nocifs sur l'environnement aquatique et/ou terrestre. Les évaluations environnementales doivent nécessairement se fonder sur des procédures et méthodes de pointe pour la caractérisation de ces effets. Dans la mesure du possible, la démarche adoptée ici doit s'harmoniser avec celle d'autres ministères fédéraux et organismes internationaux. Le présent guide vise à combler ces besoins, tout en assurant une plus grande transparence des données scientifiques sur lesquelles les décisions connexes au *Règlement sur les RSN* sont fondées<sup>7</sup>.

La communauté scientifique internationale s'active à mettre au point un certain nombre de procédures de détection des effets *pathogènes* et/ou toxiques potentiels de micro-organismes ou de *produits*

<sup>7</sup> Cet objectif est conforme à la recommandation 9.2 formulée en 2001 par le Groupe d'experts sur l'avenir de la biotechnologie alimentaire, de la Société royale du Canada, dans son rapport intitulé *Éléments de précaution : recommandations pour la réglementation de la biotechnologie alimentaire au Canada*. On peut consulter ce rapport à l'adresse <http://www.rsc.ca/foodbiotechnology/indexFR.html>.

*microbiens* sur des organismes aquatiques ou terrestres (plantes, invertébrés et vertébrés). À mesure que progresse la recherche dans ce domaine et dans d'autres champs connexes, le besoin d'appliquer systématiquement les connaissances actuelles à l'évaluation du risque, de même que d'utiliser (le cas échéant) des méthodes d'essai biologique normalisées dans ce genre d'évaluation, devient de plus en plus évident. Compte tenu de ce besoin, la Direction des substances nouvelles d'Environnement Canada a communiqué avec la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes du Centre de technologie environnementale [Environnement Canada, Ottawa (Ont.)] afin qu'elle élabore un guide détaillé sur la mesure de la pathogénicité et/ou de la toxicité, pour les organismes aquatiques et terrestres, de nouvelles substances microbiennes visées par le *Règlement sur les RSN*. Le présent guide est le fruit de cette initiative.

En vertu du *Règlement sur les RSN*, le processus de déclaration s'applique aux (nouvelles) substances microbiennes plutôt qu'aux (nouveaux) produits microbiens. Cependant, aux fins des essais de laboratoire sur les effets écologiques potentiels d'une nouvelle substance microbienne (c.-à-d. un micro-organisme donné ou un consortium de micro-organismes), un produit microbien renfermant cette substance peut servir de *matière d'essai*, dans certains cas et après entente préalable, si possible, avec les responsables du Programme des substances nouvelles. S'il y a lieu, la matière d'essai peut être un mélange de deux micro-organismes ou plus. La sous-section 3.2 renferme des informations supplémentaires et des indications sur les matières d'essai.

#### **1.1.6 Consultation avant la déclaration**

Nous recommandons fortement aux déclarants de consulter Environnement Canada et/ou Santé Canada avant d'entreprendre les *essais* qui leur permettront de se conformer aux exigences en matière de renseignements sur les effets écologiques d'une nouvelle substance microbienne. Ils pourront ainsi mieux déterminer si la méthode d'essai biologique, les organismes d'essai (*hôtes*) et la matière d'essai qu'ils se proposent d'utiliser sont acceptables. Si un déclarant souhaite utiliser des données de remplacement, des données sur un mélange de micro-organismes ou des données sur un produit microbien, il pourra justifier son choix au cours de la consultation avant la déclaration. Les demandes de

consultation (avant la présentation formelle du formulaire de déclaration) peuvent être faites par le biais de la Ligne d'information sur les substances nouvelles, au 1-800-567-1999 (au Canada) ou au 1-819-953-7156 (à l'extérieur du Canada), par télécopieur, au 1-819-953-7155, ou par courriel, à l'adresse [nsn-infoline@ec.gc.ca](mailto:nsn-infoline@ec.gc.ca).

#### **1.2 Objet et portée du présent guide**

Le présent guide se fonde sur les *Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : organismes* (EC et SC, 2001), établies conformément au *Règlement sur les RSN*, plus particulièrement sur celles qui ont un lien avec les effets écologiques des micro-organismes. Il a pour but d'aider les déclarants à choisir les organismes d'essai (*hôtes*) qui conviennent et les méthodes d'essai biologique connexes (v. sections 8 à 14). En outre, le guide servira d'instrument de travail aux consultants en environnement qui conçoivent des régimes d'essai appropriés, de même qu'aux employés de laboratoire qui mettent en œuvre un programme d'essais. À ce titre, le guide précise les procédures et conditions à appliquer avant et pendant les *essais* sur les effets pathogènes et/ou toxiques des nouvelles substances microbiennes à l'étude pour chacune des six catégories d'organismes suivantes :

- plantes aquatiques,
- invertébrés aquatiques,
- vertébrés aquatiques,
- plantes terrestres,
- invertébrés terrestres,
- vertébrés terrestres.

Le guide met l'accent sur l'adaptation et l'utilisation subséquente des méthodes d'essai biologique qui ont été normalisées par des organismes de réglementation dans le domaine de l'environnement (dont Environnement Canada) aux fins présentes et à d'autres fins (p. ex., EC, 1990a-c, 1992a-g, 1997a,b, 1998a,b, 1999a, 2000a,b, 2001a, 2002, 2004a-c). Environnement Canada a passé en revue la documentation scientifique sur ce sujet (Douville, 2001), et les informations tirées de cette étude

documentaire ont servi de fondement au présent document.

La portée du guide est limitée aux essais monospécifiques<sup>8</sup> menés en laboratoire en vue de mesurer les effets nocifs de nouvelles substances microbiennes sur des *organismes* aquatiques ou terrestres. Des indications sont donc données sur l'utilisation d'une *série* de méthodes d'essai biologique servant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des espèces et des stades du cycle biologique de plantes, d'invertébrés et de vertébrés aquatiques et terrestres répandus dans le milieu naturel canadien.

Les effets écologiques sur des microcosmes ne sont pas abordés ici, ni la conception d'études de terrain conçues pour évaluer directement les effets de nouvelles substances microbiennes appliquées sur des sites expérimentaux désignés<sup>9</sup>. Le présent guide ne traite pas non plus des essais sur le devenir (p. ex., la dispersion et la persistance) des nouvelles substances microbiennes<sup>10</sup>. Enfin, il ne renferme pas de directives sur la mesure et la définition de l'influence de variables environnementales (comme la température et le *pH*) sur la survie, la *croissance* et la réplication des micro-organismes que contient une nouvelle substance microbienne (c.-à-d. son

---

<sup>8</sup> Le *Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats* (EC, 1999b) présente le cadre des essais monospécifiques et montre que ceux-ci s'appliquent très bien aux études écotoxicologiques et aux évaluations connexes du risque écologique. Nous recommandons vivement aux intéressés de consulter ce guide, car il constitue une source d'information spécialisée qui s'avérera utile au moment de concevoir et de mener en laboratoire des essais sur les effets nocifs de nouvelles substances microbiennes et d'interpréter les résultats de ces essais.

<sup>9</sup> Le lecteur est prié de consulter la sous-section 4.3.5.1 de EC et SC (2001), de même que USEPA (1996w) s'il envisage de mener des essais en microcosme ou en mésocosme, de même que les sous-sections 4.2.4 et 4.2.5 de EC et SC (2001) s'il envisage des études expérimentales sur le terrain. Les parties 8.2.2 et 10.2.2 de ARLA (2001) renferment des indications plus précises sur la réalisation d'essais en microcosme et d'essais sur le terrain visant des agents ou produits antiparasitaires microbiens, respectivement.

<sup>10</sup> Le lecteur qui s'intéresse aux essais sur le devenir d'une nouvelle substance microbienne dans l'environnement devrait consulter la sous-section 4.2.6 de EC et SC (2001), de même que la partie 8, « Devenir dans l'environnement », de ARLA (2001).

*expression environnementale*), mais ce sujet est abordé dans ses grandes lignes à la section 2.

### 1.3 *Sommaire des sujets traités dans le présent guide*

La section 2 donne un aperçu des diverses questions connexes aux essais visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des organismes aquatiques et terrestres. Elle aborde brièvement les sujets suivants :

- (i) l'utilisation d'une méthode comportant une série d'essais sur des espèces et groupes choisis de plantes, d'invertébrés et de vertébrés aquatiques et terrestres;
- (ii) l'impossibilité, pour un grand nombre de méthodes d'essai biologique normalisées, sinon la plupart, de faire la distinction entre les effets pathogènes et les effets toxiques;
- (iii) l'intérêt porté aux effets pathogènes et/ou toxiques plutôt qu'à l'*infectivité*;
- (iv) le recours à des *témoins* adéquats dans chaque essai;
- (v) le besoin connexe de mener des essais sur l'*expression environnementale* de la nouvelle substance microbienne dans des conditions de laboratoire contrôlées.

La section 3 porte sur l'information relative aux caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de la matière d'essai; elle renferme aussi des indications sur la préparation des *concentrations* d'essai et sur leur administration aux organismes d'essai (hôtes). La section 4 donne des indications sur les divers types de témoins à inclure dans chaque essai définitif de pathogénicité et/ou de toxicité. La section 5 décrit les diverses démarches et procédures applicables aux essais d'infectivité, en étroite concordance avec celles visant les essais de pathogénicité et/ou de toxicité. La section 6 aborde les principes de *bonnes pratiques de laboratoire* (tirés de celles établies par l'OCDE) associés à l'*assurance* et au *contrôle de la qualité*, principes qu'il convient d'appliquer à tous les essais définitifs sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une substance, et ce, pour garantir la qualité et la validité des résultats des essais. La section 7 traite des questions entourant la



sécurité des employés de laboratoire et le traitement humanitaire des animaux soumis aux essais. La section 8 renferme des directives sur le choix de séries appropriées de méthodes d'essai biologique. Les sections 9 à 14 décrivent les méthodes d'essai biologique recommandées pour chacune des catégories d'organismes d'essai (plantes, invertébrés et vertébrés aquatiques ou terrestres). Enfin, la section 15 donne des indications sur les rapports à établir au terme de chaque essai de pathogénicité et/ou de toxicité.

Les sections 9 à 14 portent sur les méthodes d'essai biologique recommandées pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur les plantes et animaux aquatiques et terrestres. Chacune de ces six sections est consacrée à une catégorie particulière d'organismes d'essai : plantes aquatiques, invertébrés aquatiques, vertébrés

aquatiques, plantes terrestres, invertébrés terrestres, vertébrés terrestres. Chacune comporte un résumé des procédures et méthodes utilisées par les chercheurs pour déterminer les effets de divers micro-organismes ou produits microbiens sur la catégorie d'organismes visés. Ce résumé est suivi d'une description de la ou des méthodes d'essai biologique normalisées que l'on recommande d'utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de diverses substances microbiennes sur la catégorie d'organismes visés. Des détails sont également fournis sur les modifications et adaptations qui conviennent à chaque essai recommandé. Chaque section fait aussi état d'autres méthodes ou procédures spéciales pouvant convenir aux essais sur l'effet ou les effets nocifs que peut avoir une nouvelle substance microbienne particulière sur les organismes en question ou sur d'autres *hôtes* de chaque grande catégorie.

## Section 2

### Aperçu

Le présent guide a pour point de départ la sous-section 4.2.7 des directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles, y compris les micro-organismes, publiées conjointement par Environnement Canada et Santé Canada (EC et SC, 2001), qui se lit comme suit :

*Le déclarant doit fournir des données d'essais relatives aux effets du micro-organisme à l'égard d'espèces de végétaux, d'invertébrés et de vertébrés appropriées des environnements aquatique et terrestre. Des données de six essais (plantes, vertébrés et invertébrés aquatiques, ainsi que plantes, vertébrés et invertébrés terrestres) sont exigées pour les déclarations en vertu du paragraphe 29.11(1) [du Règlement sur les RSN pris en application de la LCPE 1999], tandis que trois essais (soit plantes, vertébrés et invertébrés aquatiques, soit plantes, vertébrés et invertébrés terrestres) sont exigés pour les déclarations en vertu de l'alinéa 29.11(2)a du Règlement. Ces données d'essais doivent provenir d'essais in vivo sur des végétaux ou des animaux.*

Conformément à ces directives, lorsqu'un déclarant veut importer ou fabriquer au Canada une nouvelle substance microbienne et que le milieu récepteur n'est pas limité à une écozone en particulier, il doit procéder, dans la plupart des cas, à six essais faisant appel à des plantes, des invertébrés et des vertébrés aquatiques et terrestres (Gouvernement du Canada, 1997)<sup>11</sup>. Seulement trois essais sont exigés lorsque la nouvelle substance microbienne ne doit être introduite que dans une écozone où le micro-organisme n'est pas indigène (EC et SC, 2001)<sup>12</sup>. Le déclarant n'est pas tenu de mener des essais de pathogénicité et/ou de toxicité s'il prévoit d'introduire la nouvelle substance microbienne dans une ou plus d'une écozone où le

micro-organisme est indigène (Gouvernement du Canada, 1997); d'autres circonstances semblables peuvent également s'appliquer [v. EC et SC (2001), § 4.2.7.1)].

Le présent guide vise à compléter les *Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : organismes* (EC et SC, 2001) en regard des essais de pathogénicité et/ou de toxicité de substances nouvelles qui sont des micro-organismes. Il en étoffe en particulier la sous-section 4.2.7, intitulée « Informations relatives aux effets écologiques du micro-organisme », tout en tablant sur les directives de ce document pour ce qui est des renseignements connexes exigés. Par exemple, les exigences suivantes de la section 4 de EC et SC (2001) en matière de renseignements techniques s'appliquent aux essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur les plantes ou animaux aquatiques ou terrestres :

- (i) information relative aux caractéristiques biologiques, physiques et chimiques de la nouvelle substance microbienne;
- (ii) information connue relative aux réactions d'ordre biologique et écologique et à l'adaptabilité de la nouvelle substance microbienne (y compris son *expression environnementale*);
- (iii) information relative aux études de terrain portant sur les effets écologiques d'une substance;
- (iv) information relative au devenir de la nouvelle substance microbienne dans l'environnement;
- (v) information relative aux incidences de la nouvelle substance microbienne sur la santé humaine.

Il convient de consulter et d'observer les directives de EC et SC (2001) en matière de déclaration et d'essai afin de s'assurer de la conformité des renseignements fournis.

En plus de compléter et d'étoffer les directives précitées, le présent guide se fonde sur un certain

<sup>11</sup> On trouvera à l'annexe 2 de EC et SC (2001) une carte des 15 écozones du Canada.

<sup>12</sup> On exige un moins grand nombre d'essais dans ce cas du fait que le milieu récepteur est restreint, tout comme le nombre de plantes, d'invertébrés et de vertébrés susceptibles d'être exposés.

nombre d'autres documents clés ayant trait à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des organismes aquatiques ou terrestres. En 1995, Environnement Canada a tenu un atelier sur la déclaration de renseignements sur les dangers des produits microbiens de la biotechnologie aux termes de la LCPE (EC, 1996). La sous-section 4.2.7.1 de EC et SC (2001) reprend une grande partie des principes de déclaration dont sont convenus les participants à cet atelier. Les *Series 885 Microbial Pesticide Test Guidelines*<sup>13</sup> publiées en 1996 par l'USEPA (Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances) renferment une mine de renseignements portant spécifiquement sur les essais qui visent à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de pesticides microbiens sur des espèces choisies de plantes et d'animaux aquatiques et terrestres (USEPA, 1996a-v). L'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA, 2001) de Santé Canada s'est appuyée sur cette série pour établir les exigences liées à l'homologation des agents antiparasitaires microbiens (AAM) ou leurs *préparations commerciales* (PC). La Directive européenne de 1991 relative à l'homologation de pesticides, dont les produits microbiens, s'appuie également sur les lignes directrices (sans préciser lesquelles; on y indique seulement « *e.g., the USEPA testing guidelines* ») qu'une autorité compétente a approuvées par suite d'une série d'essais sur des organismes aquatiques et terrestres, mais sans fournir d'indications précises applicables à des méthodes d'essai biologique individuelles (Douville, 2001). Le Japon, dans une démarche modelée sur celle de l'USEPA (1996a,b), a adopté des lignes directrices pour les essais d'AAM et de PC qui sont fondées sur une série d'essais monospécifiques sur des plantes et des animaux aquatiques et terrestres (Katoh, 2001). Une grande partie des directives décrites dans les sections qui suivent sont en harmonie avec ces démarches internationales.

Le présent guide est centré sur les méthodes d'essai biologique et les procédures connexes recommandées pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité de nouvelles substances microbiennes en regard d'espèces et de stades du cycle biologique sensibles de plantes et d'animaux aquatiques et terrestres. La

*pathogénicité* désigne la capacité d'un micro-organisme d'infecter un hôte (dans le présent contexte, un organisme d'essai), de s'y établir et de s'y multiplier, puis d'infliger des lésions ou des dommages susceptibles ou non de mener à la mort. La *toxicité* est la capacité d'une substance d'essai de provoquer, en raison de sa nature toxique, des effets nocifs (*sublétaux* ou *létaux*) chez des plantes ou des animaux vivants. Ces deux termes sont inextricablement liés, tout comme la mesure des effets pathogènes ou toxiques que peut avoir une nouvelle substance microbienne sur des organismes d'essai (hôtes).

Les substances pathogènes et toxiques peuvent provoquer des anomalies apparentes ou microscopiques (c.-à-d. des dommages aux tissus ou aux organes détectables au cours d'une *autopsie* ou d'un examen histologique). Ces substances peuvent aussi avoir des *effets sublétaux*, comme un retard de croissance ou une altération du succès de reproduction, deux *paramètres* biologiques courants dans les *essais de toxicité* sublétaux. Les substances pathogènes et toxiques peuvent causer la mort des organismes hôtes. En outre, certains micro-organismes élaborent des *toxines* susceptibles d'avoir des effets sur les organismes d'essai (hôtes) en suscitant une réponse toxique (on parle alors de *toxino-génicité*). On trouve dans certains produits microbiens des substances organiques ou inorganiques pouvant provoquer une réponse toxique, soit par elles-mêmes, soit en combinaison avec les micro-organismes présents. L'USEPA (1996b,n) a reconnu ce fait en affirmant que les méthodes d'essai biologique recommandées pour mesurer les effets nocifs d'AAM (ou leur PC) sont conçues pour évaluer simultanément la toxicité et la pathogénicité. Du fait que les paramètres biologiques mesurés au cours d'essais de laboratoire normalisés sur les effets nocifs (p. ex., réduction de la croissance, altération du succès de reproduction, modification du comportement, pathologies apparentes ou microscopiques, mort) que peuvent avoir des micro-organismes ne permettent pas de déterminer si ces effets sont attribuables à leur pathogénicité ou à leur toxicité, ces méthodes sont appelées *essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques* ou *essais de pathogénicité et/ou de toxicité* aux fins du présent document.

Il convient de souligner que les organismes hôtes réagissent différemment aux substances dont les

<sup>13</sup> Chacune des directives de cette série peut être consultée sur Internet à l'adresse [http://www.epa.gov/docs/OPPTS\\_Harmonized/](http://www.epa.gov/docs/OPPTS_Harmonized/); choisir « 885 - Microbial Pesticide Test Guidelines ».

principaux effets nocifs sont attribuables soit à leurs propriétés toxiques (intoxication), soit à leurs propriétés pathogènes (maladie). La réaction de ces organismes à diverses concentrations d'une substance chimique toxique est généralement prévisible [selon une courbe effet-log(concentration)], ce qui n'est généralement pas le cas lorsque des substances microbiennes sont en cause. Les réactions des organismes d'essai en fonction de la concentration d'une substance pathogène (et en fonction du temps) peuvent différer grandement de celles que provoque une substance chimique toxique. Les substances chimiques toxiques peuvent être diluées au point de devenir inoffensives, mais les micro-organismes qui ont réussi à infecter un organisme d'essai (hôte) peuvent se multiplier — au départ, il suffit de quelques unités microbiennes envahissantes — et causer des effets sublétaux ou létaux, et ce, en fonction du temps et de la sensibilité de l'hôte et si les conditions s'y prêtent. C'est pourquoi la manifestation d'effets pathogènes chez les organismes hôtes exposés à de nouvelles substances microbiennes infectieuses est souvent sans lien avec les concentrations initiales de l'exposition – ces effets n'apparaissent pas d'une manière prévisible (logarithme de la concentration), comme ceux causés par des substances chimiques toxiques. Sutter (1985) précise, à juste titre, qu'« il est généralement impossible de corrélérer la concentration d'un organisme introduit et un effet donné [...] ». Font exception les micro-organismes pathogènes qui exercent leur effet nocif en produisant des endotoxines ou des métabolites toxiques, ou les substances (non biologiques) associées à une nouvelle substance microbienne (p. ex., une substance présente dans un produit microbien) dont la nocivité est fonction de la concentration.

La rapidité avec laquelle des effets sublétaux ou létaux se manifestent dépend de divers facteurs, dont la concentration de l'exposition, la nature du toxique et la sensibilité de l'organisme d'essai. Les micro-organismes infectieux qui envahissent un organisme hôte en petit nombre peuvent toutefois se multiplier (se répliquer) dans ses tissus et organes pendant une longue période avant que ne se manifestent leurs effets pathogènes. Des articles généraux font état d'autres écarts dans la manifestation des effets selon qu'il s'agit de micro-organismes pathogènes ou de substances chimiques toxiques (Suter, 1985; Dean-Ross, 1986; Briggs et Sands, 1992; Spacie, 1992). Compte tenu de ces écarts, il faut modifier certaines

procédures lorsqu'on applique des méthodes d'essai biologique normalisées à de nouvelles substances microbiennes susceptibles d'avoir des effets tant pathogènes que toxiques. Le présent guide des essais monospécifiques visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur les organismes aquatiques ou terrestres renferme des recommandations concernant les modifications à apporter aux procédures et conditions connexes aux méthodes d'essai biologique conçues au départ pour mesurer les effets toxiques de substances chimiques.

Autre corollaire du lien inextricable entre les effets pathogènes et toxiques et de l'impossibilité de les différencier clairement, l'article 64 de la LCPE 1999 définit « substance toxique » comme suit :

*Est toxique toute substance qui pénètre ou peut pénétrer dans l'environnement en une quantité ou une concentration ou dans des conditions de nature à :*

- a) avoir, immédiatement ou à long terme, un effet nocif sur l'environnement ou sur la diversité biologique;*
- b) mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie humaine; ou*
- c) constituer un danger au Canada pour la vie ou la santé humaines.*

Conformément à cette définition, une nouvelle substance microbienne qui a ou peut avoir un effet nocif sur l'environnement (ou qui constitue ou peut constituer un danger pour l'environnement) est considérée comme « toxique aux termes de la LCPE 1999 », que cet effet soit attribuable à sa pathogénicité ou à sa toxicité (ou les deux).

Il est vivement recommandé de procéder à la caractérisation biologique et physicochimique de la nouvelle substance microbienne qui fera l'objet d'essais visant à déterminer ses effets pathogènes et/ou toxiques sur les organismes hôtes, caractérisation qui constitue une condition préalable essentielle à de tels essais. La section 3 fait état des indications clés que l'on trouve dans EC et SC (2001) à cet égard. Cette même section fournit des orientations sur la préparation de certaines nouvelles substances microbiennes à administrer dans l'eau, le *sédiment*, le sol et les aliments au début des essais (et parfois durant ceux-ci) sur les effets pathogènes et/ou toxiques de ces substances sur certaines catégories

d'organismes d'essai (hôtes). On y trouve aussi les concentrations recommandées pour les essais à concentration unique ou à concentrations multiples. De plus, la section 3 renferme des directives sur la quantification de la concentration de micro-organismes viables à effectuer au début d'essais individuels et, selon la méthode choisie, pendant le déroulement de l'essai et/ou à la fin de celui-ci.

Pour que les résultats d'un essai de pathogénicité et/ou de toxicité mené en laboratoire soient considérés comme valables et probants, un *traitement* comportant un *témoin négatif* doit faire partie intégrante de cet essai. Il convient aussi d'inclure, dans certains essais, des *témoins positifs* (chimiques et/ou microbiens) aux fins de l'*assurance de la qualité* et du *contrôle de la qualité*. Un *témoin sur filtrat stérile* et/ou un *témoin non infectieux* peuvent également s'avérer utiles; on recommande d'inclure ces témoins dans la plupart des essais, car ils faciliteront l'interprétation des résultats et, en particulier, fourniront des indices quant à la cause (c.-à-d. pathogénicité et/ou toxicité) des effets nocifs observés pendant un essai de laboratoire donné faisant appel à une nouvelle substance microbienne. La section 4 porte sur les divers types de traitements témoins recommandés ou exigés pour les essais portant sur la mesure de ces effets.

L'*infectivité* désigne la capacité d'un micro-organisme de traverser ou de contourner les barrières naturelles de l'hôte contre l'infection. La mesure de l'infectivité n'est pas un élément indispensable des essais contrôlés dont l'objet est de mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne; toutefois, elle peut être utile pour déterminer si les effets nocifs observés sont susceptibles d'être attribuables à une infection et aux symptômes associés à une *maladie* (c.-à-d. à la pathogénicité de la substance). C'est pourquoi des mesures simultanées de l'infectivité devraient être envisagées au cours de la planification des méthodes d'essai biologique (et des procédures d'essai connexes) à appliquer pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité d'une nouvelle substance microbienne. La section 5 fournit des indications sur la mesure de l'infectivité pendant certains essais; on trouvera d'autres directives sur ce sujet dans les sections consacrées aux méthodes d'essai biologique recommandées pour des catégories données d'organismes d'essai (hôtes) (sections 9 à 14).

La connaissance du comportement d'une nouvelle substance microbienne dans divers milieux naturels (air,

eau, sédiment ou sol) est très utile, voire essentielle, lors du choix des séries appropriées de méthodes d'essai biologique qui serviront à mesurer et à évaluer les effets écologiques nocifs de cette substance. On trouvera dans USEPA (1996x,y,z,aa) une description des essais de laboratoire portant sur l'*expression environnementale* de micro-organismes. Ces essais permettent de déterminer, dans des conditions contrôlées, l'effet que peut avoir la modification de certaines variables environnementales (p. ex., température, pH, conductivité ou *salinité*, intensité lumineuse, oxygène dissous et turbulence, dans le cas de l'environnement aquatique; température, pH, intensité lumineuse, humidité, précipitations et éléments nutritifs, dans le cas de l'environnement terrestre) sur la survie et la réplication des micro-organismes. À l'alinéa v) de la sous-section 4.2.1.6 de EC et SC (2001), on demande au déclarant de fournir une description des plages et des valeurs optimales de variables environnementales importantes ayant trait à la survie et à la réplication des micro-organismes. Les parties 2.7.2 et 8.2 des directives de Santé Canada sur l'homologation d'AAM et de PC (ARLA, 2001) dressent la liste des renseignements qu'il convient de fournir, dans le cadre du processus d'homologation, sur les réactions biologiques de pesticides microbiens à certaines variables environnementales. Les personnes qui choisissent les séries d'essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne particulière devraient disposer de renseignements de base sur l'*expression environnementale* de celle-ci avant de prendre des décisions quant aux méthodes d'essais qui seront retenues. Ces renseignements incluent des données sur l'influence que peuvent avoir, sur la survie, la croissance et la réplication des micro-organismes, des variations des conditions clés des essais (p. ex., température, pH, éclairage, conductivité ou salinité pour les essais sur des organismes aquatiques; humidité et/ou teneur en eau de la substance si celle-ci est administrée directement ou indirectement à des organismes terrestres), dont celles qui seraient appliquées ou qui pourraient l'être lors de chacun des essais envisagés.

Les encadrés avec puces mettent en relief les points saillants de certaines sections et sous-sections du présent guide. Ces « Repères » servent d'introduction aux éléments les plus importants abordés dans les pages ou les paragraphes subséquents. Étant donné qu'ils ne peuvent expliquer entièrement les diverses recommandations et leurs implications, on incite le lecteur à la recherche d'indications sur divers sujets à lire le texte qui suit les encadrés.

## Caractérisation, préparation et administration de nouvelles substances microbiennes

### 3.1 Caractéristiques connues de la matière d'essai

#### Repères

- *Les caractéristiques biologiques et physicochimiques de la matière d'essai devraient être connues avant de choisir et d'appliquer une série de méthodes d'essai biologique en vue de mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne.*
- *Il convient de consulter la sous-section 4.2 de EC et SC (2001), qui décrit les exigences en matière de renseignements techniques sur la caractérisation de la matière d'essai, puis d'obtenir, d'évaluer et de prendre en compte ces renseignements.*
- *L'information relative à l'expression environnementale de la nouvelle substance microbienne est particulièrement pertinente et importante.*

Les caractéristiques biologiques et physicochimiques de chaque nouvelle substance microbienne dont on évalue les effets pathogènes et/ou toxiques devraient être connues avant le début des essais en laboratoire. Les personnes responsables du choix et de l'exécution de la série de méthodes d'essai biologique à appliquer à la matière d'essai (c.-à-d. une nouvelle substance microbienne ou, dans certains cas, un mélange de micro-organismes ou un produit microbien renfermant cette substance) devraient examiner attentivement ces caractéristiques et en tenir compte avant d'entreprendre le programme d'essais.

La partie II.1 et l'annexe XV correspondante du *Règlement sur les RSN* pris en application de la LCPE 1999 précisent les renseignements à fournir sur les micro-organismes<sup>14</sup>. La sous-section 3.2 de EC et SC (2001) explique comment identifier les renseignements à fournir conformément à la partie II.1 du Règlement. La sous-section 4.2 de EC et SC (2001) renferme de plus amples détails sur les

<sup>14</sup> Ce règlement est accessible sur Internet à l'adresse <http://lois.justice.gc.ca/fr/C-15.31/> : sous « Règlements apparentés », choisir « Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles ». La partie II.1 et l'annexe XI du Règlement sont affichées séparément dans la liste connexe.

exigences en matière de renseignements techniques concernant les caractéristiques des nouvelles substances microbiennes :

- l'identification (nom taxonomique) du micro-organisme (§ 4.2.1.1);
- l'historique de l'utilisation du micro-organisme (y compris les conditions de culture et d'entreposage; le nom de la souche, le cas échéant; les méthodes d'isolement et d'identification; les modifications génétiques) (§ 4.2.1.3);
- la description des modifications apportées au micro-organisme (§ 4.2.1.4);
- la description des méthodes pouvant servir à différencier et à détecter le micro-organisme (§ 4.2.1.5);
- la description des caractéristiques biologiques et écologiques connues du micro-organisme, dont les suivantes : cycle biologique; infectivité; pathogénicité; toxicité et toxogénicité vis-à-vis des espèces non humaines; tolérance vis-à-vis des métaux lourds, des pesticides et des *antimicrobiens*; rôle dans les cycles biogéochimiques; conditions nécessaires à la survie, à la croissance et à la réplication, et conditions qui limitent ces processus<sup>15</sup>;

<sup>15</sup> Comme il est indiqué dans cette sous-section de EC et SC (2001), il convient de fournir des renseignements sur les plages et les valeurs optimales de paramètres environnementaux importants, comme le pH, la température, la salinité (dans le cas d'une eau *estuarienne* ou *marine*), l'oxygène et la granulométrie (dans le cas d'un sédiment ou d'un sol), qui influent sur la survie, la croissance et/ou la réplication du micro-organisme. Lorsqu'on sait que des paramètres particuliers limitent la survie, la croissance ou la réplication, on doit fournir des renseignements sur ces paramètres. La section 2 du présent guide traite plus en détail des mesures de l'expression environnementale et de leur importance au moment de concevoir un ensemble approprié d'essais biologiques visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne et d'interpréter les résultats des essais de laboratoire ayant trait aux effets écologiques possibles de cette dernière.

- mécanismes de dispersion du micro-organisme (§ 4.2.1.6);
- la description du mode d'action connu du micro-organisme, par rapport à l'utilisation à laquelle il est destiné (p. ex., manière dont le micro-organisme altère l'environnement physique, chimique et biologique) (§ 4.2.1.7);
- la description des sous-produits qui résulteront vraisemblablement de l'introduction du micro-organisme dans l'environnement (§ 4.2.1.8);
- la description des possibilités et des mécanismes de transfert de matériel génétique à d'autres organismes, dont des caractéristiques comme la pathogénicité, la toxino-génicité et la résistance aux antimicrobiens (§ 4.2.1.10);
- la description de la répartition géographique du micro-organisme (§ 4.2.1.11);
- l'état physique du produit microbien [p. ex., poudre, suspension, vapeur; taille des particules (granulométrie); nature de tout milieu porteur] (§ 4.2.2.4);
- la concentration du micro-organisme dans le produit microbien (§ 4.2.2.5);
- l'identification et la concentration des autres ingrédients et des *contaminants* présents dans le produit microbien (§ 4.2.2.6);
- la viabilité du micro-organisme dans le produit microbien (§ 4.2.2.7);
- la description des méthodes recommandées pour son entreposage et son élimination (§ 4.2.2.8);
- l'information relative au devenir du micro-organisme dans l'environnement (p. ex., plantes et animaux susceptibles d'être exposés au micro-organisme, en fonction de l'utilisation à laquelle l'organisme est destiné; description des habitats dans lesquels l'organisme peut persister ou proliférer; quantités estimatives du micro-organisme dans l'air, l'eau et le sol aux points d'introduction) (§ 4.2.6);
- l'information disponible sur les effets écologiques du micro-organisme (§ 4.2.7);

- l'information relative aux incidences du micro-organisme sur la santé humaine (p. ex., toute documentation relative au rôle du micro-organisme quant aux effets nocifs sur la santé humaine; description des caractéristiques qui le distinguent des agents *pathogènes* connus; données provenant des essais de sensibilité aux antimicrobiens; données des essais de pathogénicité pour des micro-organismes apparentés; risques de réactions *immunologiques* nocives chez les personnes exposées au micro-organisme; nombre estimatif de personnes susceptibles d'être exposées au micro-organisme et degré d'exposition) (§ 4.2.8).

Les personnes responsables du choix, de la conception et de la conduite des essais de laboratoire sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne pour les organismes aquatiques ou terrestres devraient consulter les sections pertinentes de EC et SC (2001) afin d'obtenir plus de détails sur les renseignements exigés. Elles devraient aussi analyser toute l'information pertinente sur les caractéristiques biologiques et physicochimiques d'une nouvelle substance microbienne avant le début des essais biologiques sur les effets écologiques de cette dernière. Cette information documentaire devrait également être prise en compte lors de l'interprétation des résultats des essais de pathogénicité et/ou de toxicité menés en laboratoire.

### 3.2 Matière d'essai et mode(s) d'exposition

#### **Repères**

- *L'une ou l'autre des matières suivantes peut convenir aux méthodes d'essai biologique de pathogénicité et/ou de toxicité : une culture pure d'un micro-organisme donné; un consortium de micro-organismes; un mélange de deux cultures pures ou plus de micro-organismes donnés; un échantillon représentatif de produit microbien de formulation commerciale.*
- *Avant de mettre la dernière main au programme d'essais ou de l'entreprendre, il est vivement recommandé de consulter la Direction des substances nouvelles (DSN) afin de discuter de la matière d'essai qui sera utilisée dans les essais prévus et de prendre une décision.*

- *Les organismes d'essai (hôtes) devraient être exposés à une nouvelle substance microbienne selon le ou les principaux modes d'exposition auxquels on prévoit qu'ils seront soumis dans le milieu naturel.*
- *Si un essai à concentration unique comportant deux modes d'exposition à leur CDM respective s'avère nocif pour les organismes d'essai (hôtes) et qu'aucun effet nocif n'est observé lors d'un essai à concentrations multiples et un seul de ces deux modes à la CDM et à des concentrations plus faibles, il faut procéder à un deuxième essai à concentrations multiples en utilisant l'autre mode d'exposition inclus dans l'essai à concentration unique.*
- *Dans un essai donné, le ou les modes d'exposition peuvent influencer sur le type d'organismes d'essai et sur la méthode d'essai biologique à employer, tout autant qu'ils peuvent en dépendre. Les modes d'exposition appropriés (selon la méthode d'essai utilisée) incluent une suspension dans l'eau, un mélange dans le sédiment ou le sol et un mélange dans les aliments des organismes d'essai. Dans le cas des vertébrés terrestres (p. ex., oiseaux ou petits mammifères), il pourrait s'agir, selon la nature de la matière d'essai et la manière dont on prévoit qu'elle pénétrera dans l'environnement, d'une administration par voie orale (gavage) ou par inhalation.*
- *Il convient de restreindre les modes d'exposition multiples aux essais à concentration unique menés sur des espèces de plante, d'invertébré ou de poisson; ces modes ne sont recommandés que lorsque plus d'un type d'exposition de l'organisme d'essai (p. ex., eau et aliments; eau et sédiment; eau et sol) sont possibles ou anticipés dans le milieu naturel, selon l'utilisation prévue de la nouvelle substance microbienne.*

Les exigences en matière de données sur les essais de laboratoire visant à déterminer les effets écologiques d'un micro-organisme désigné *substance nouvelle* sont décrites à l'annexe XV du *Règlement sur les RSN*. Conformément à ce règlement et à sa définition de « substance nouvelle » (EC et SC, 2001), le processus de déclaration (y compris l'inscription, sur la LIS, de micro-organismes existant sur le marché canadien) s'applique aux nouveaux micro-organismes plutôt qu'aux nouveaux produits microbiens. Toutefois, aux fins des essais de laboratoire sur les effets écologiques potentiels d'une nouvelle substance microbienne, un produit microbien peut,

dans certains cas, servir de matière d'essai<sup>16</sup>. S'il y a lieu, la matière d'essai peut être un mélange de deux micro-organismes ou plus<sup>17</sup>. En conséquence, la matière d'essai peut être :

- une culture pure d'un micro-organisme,
- un *consortium*,
- un *mélange* de deux cultures pures ou plus,
- un produit microbien.

Avant de procéder à des essais de laboratoire définitifs sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne, le déclarant (et, selon le cas, les consultants et le directeur de l'étude responsable de chaque essai; v. § 6.1) devrait consulter des représentants de la DSN d'Environnement Canada (v. § 1.1.6). Une telle consultation permet notamment de discuter du programme d'essais proposé et, pour chaque méthode d'essai à appliquer, de la matière d'essai et de l'organisme d'essai (hôte) prévus. Le choix de la matière d'essai dépend d'un certain nombre de facteurs, dont les caractéristiques physicochimiques connues de la nouvelle substance microbienne, les ingrédients entrant dans la préparation du produit microbien et la méthode d'essai biologique envisagée.

<sup>16</sup> Si un produit microbien renferme un adjuvant ou un porteur qui accroît la pathogénicité et/ou la toxicité d'une nouvelle substance microbienne, ce produit pourrait être considéré comme la matière d'essai à privilégier. Les adjuvants et porteurs utilisés dans un produit microbien doivent également figurer sur la LIS. S'ils constituent des *substances nouvelles*, ils doivent être déclarés. Les *Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : substances chimiques et polymères* (Gouvernement du Canada, 2001) renferment des renseignements supplémentaires sur ce sujet.

<sup>17</sup> Chaque micro-organisme de ce mélange doit être déclaré séparément s'il n'apparaît pas sur la LIS. Il est cependant possible d'utiliser, à titre de données de remplacement, les données recueillies sur ce mélange, et ce, pour chaque micro-organisme à déclarer. Avant de procéder aux essais, le déclarant devrait demander conseil à Environnement Canada (v. § 1.1.6, « Consultation avant la déclaration ») et prendre en compte les caractéristiques connues de chaque culture pure présente dans le mélange. Si le déclarant soupçonne que des effets écologiques potentiels sur les organismes d'essai (hôtes) sont masqués (réduits) en raison de leur interaction, il devrait envisager la possibilité de mener des essais distincts sur certaines des cultures pures, sinon sur l'ensemble de celles-ci, afin de vérifier si elles ont des effets pathogènes et/ou toxiques.



Pour les essais sur des organismes hôtes aquatiques ou terrestres (v. sections 9 à 14), la nouvelle substance microbienne constitue la matière d'essai dont le *Règlement sur les RSN* exige la déclaration. Les déclarants doivent cependant savoir que, dans certains cas, le produit microbien préparé (plutôt que la nouvelle substance microbienne) devrait faire l'objet d'essais. Par exemple, si un produit microbien renferme un adjuvant ou un porteur dont on sait ou présume qu'il accroît la pathogénicité et/ou la toxicité d'une nouvelle substance microbienne, ce produit pourrait être considéré comme la matière d'essai à privilégier<sup>18</sup>. À l'inverse, si le porteur inanimé utilisé dans le produit microbien est associé à une demande d'oxygène élevée une fois mélangé dans l'eau, ce qui (d'après des études préliminaires) réduit l'oxygène dissous dans les enceintes expérimentales renfermant des invertébrés (p. ex., *Daphnia magna*; v. § 10.1.2) ou des poissons (v. section 11) et entraîne des effets nocifs sans lien avec la pathogénicité et/ou la toxicité du produit, il serait alors préférable d'utiliser seulement la ou les nouvelles substances microbiennes dans les essais aquatiques. Lors du choix de la matière d'essai, il faudrait aussi tenir compte de l'influence que peut avoir un adjuvant inerte sur la solubilité du produit auquel il est ajouté. Si le porteur et le produit microbien obtenu ne sont pas très solubles dans l'eau, on pourrait envisager de n'utiliser que la nouvelle substance microbienne pour les essais de laboratoire. Dans le cas des essais sur des oiseaux ou de petits mammifères (v. § 14.1 et 14.2), il est également préférable, dans la plupart des cas, de n'utiliser que la ou les nouvelles substances microbiennes (plutôt que le produit microbien) comme matière d'essai, car la quantité de matière inorganique et/ou organique inanimée entrant dans certains produits microbiens peut provoquer un stress excessif (et des effets nocifs sans lien avec la pathogénicité et/ou la toxicité du produit) lors d'une administration par voie orale ou par inhalation.

Dans un essai donné, toute matière d'essai administrée à plus d'une occasion doit provenir du même *sous-lot*, sauf si l'on sait que la nouvelle substance microbienne ou sa préparation sera instable pendant son entreposage ou risque de l'être. Dans ce cas, il faudrait utiliser, lors de chaque administration

de la matière d'essai, des préparations fraîches de la nouvelle substance microbienne, chacune étant préparée selon une procédure identique. Idéalement, la matière d'essai utilisée dans chacune des méthodes d'essai biologique de la série devrait provenir du même sous-lot. S'il est impossible de procéder ainsi, tous les sous-lots de la matière d'essai devraient être préparés selon une procédure identique (ou formule identique dans le cas d'un produit) et présenter des caractéristiques physicochimiques et biologiques (v. § 3.1) les plus semblables possibles.

Lors du choix de la matière d'essai à utiliser dans une méthode d'essai biologique particulière (v. sections 9 à 14), il importe de tenir compte de l'état de la nouvelle substance microbienne. Par exemple, si la matière d'essai renferme des spores bactériennes ou fongiques, il faudrait déterminer lequel de son état de spore ou de son état végétatif est le plus susceptible d'avoir des effets pathogènes et/ou toxiques sur les organismes d'essai (hôtes). Si l'information disponible sur la nouvelle substance microbienne ou une substance semblable indique que c'est l'état végétatif plutôt que l'état de spore qui aura vraisemblablement des effets nocifs sur un organisme hôte particulier, il faudrait envisager de mener un essai sur cet hôte en utilisant une culture de l'état végétatif. Par contre, si des indices portent à croire que c'est l'état fongique qui risque davantage d'avoir des effets pathogènes et/ou toxiques (p. ex., dans un essai mettant en cause une spore fongique donnée et des plantes terrestres), on fera plutôt appel à cet état de la nouvelle substance microbienne pour l'essai. Il faudrait, dans le cadre du processus de consultation avant la déclaration, discuter avec le personnel de la DSN d'Environnement Canada de la décision conditionnelle d'utiliser un état particulier (état végétatif, état fongique ou kyste) d'une nouvelle substance microbienne dans la ou les méthodes d'essai biologique prévues sur les effets pathogènes ou toxiques (v. § 1.1.6).

La façon dont les organismes d'essai (hôtes) seront exposés à une nouvelle substance microbienne dépend d'un certain nombre de facteurs, dont les suivants :

- 1) le type d'organisme hôte;
- 2) la méthode d'essai biologique retenue;

<sup>18</sup> Il est possible qu'un déclarant ne dispose pas d'une PC microbienne au moment de remplir son formulaire de déclaration. Dans ce cas, il doit démontrer que les adjuvants prévus n'accroîtront pas les effets pathogènes et/ou toxiques potentiels de la substance déclarée.

- 3) la nature de la matière d'essai (p. ex., suspension liquide ou solide en granules);
- 4) le mode prévu d'administration de la nouvelle substance microbienne (p. ex., pulvérisation ou sous forme de poudre ou de granules).

En règle générale, les organismes hôtes devraient être exposés à une nouvelle substance microbienne (seule ou dans le produit microbien) selon la ou les principales voies d'exposition auxquelles on prévoit qu'ils seront soumis dans le milieu naturel. Il est essentiel que la forme sous laquelle la nouvelle substance microbienne (ou, selon le cas, le produit microbien renfermant cette substance) est mise à l'essai soit celle la plus susceptible de provoquer des effets pathogènes et/ou toxiques sur les plantes et animaux aquatiques et terrestres.

Dans un essai à concentration unique (v. § 3.3.1), une seule concentration expérimentale est utilisée pour chaque mode d'exposition prévu. Certaines méthodes d'essai, comme celles sur les plantes aquatiques (v. § 9.1.2 et 9.2.2), certains invertébrés aquatiques (v. § 10.1.2) ou les vertébrés terrestres (v. § 14.1.2 et 14.2.2), comporteront une seule concentration et un seul mode d'exposition (p. ex., dans l'eau ou, dans le cas d'oiseaux ou de petits mammifères, par gavage ou par inhalation). D'autres pourront comporter deux modes d'exposition appliqués simultanément aux organismes d'essai (hôtes) [p. ex., eau et sédiment pour certaines espèces d'invertébrés aquatiques; aliments et eau pour les crevettes ou les poissons; sol et eau pour une plante terrestre; sol et aliments pour certains invertébrés endogés (vivant dans le sol)]. Une telle « exposition combinée » est économique; on recommande de l'utiliser pour certains essais à concentration unique lorsque plus d'un mode d'exposition (p. ex., aliments et eau dans le cas des crevettes et des poissons; eau et sédiment dans celui des espèces endofauniques aquatiques, comme les amphipodes ou les vers polychètes) est associé à l'utilisation prévue d'une nouvelle substance microbienne donnée. Dans un essai à concentrations multiples (v. § 3.3.2), il s'avère peu pratique d'utiliser plus d'un mode d'exposition<sup>19</sup>; c'est pourquoi on

inclura un seul mode. Lorsque plus d'un mode d'exposition à une nouvelle substance microbienne particulière est possible ou soulève des préoccupations d'ordre écologique, il convient de mener, pour chaque mode, un essai distinct à concentrations multiples. Par exemple, dans des essais visant une espèce de poisson, on pourrait exposer un groupe d'organismes d'essai (hôtes) à une gamme de concentrations de la nouvelle substance microbienne dans l'eau, tandis qu'un deuxième groupe serait exposé à la même gamme de concentrations par le biais des aliments. Lorsque les résultats d'un essai à concentrations multiples révèlent l'absence d'un effet nocif à la CDM (et à des concentrations plus faibles), cela peut signifier que le mode d'exposition n'était sans doute pas celui à l'origine des effets nocifs observés dans l'essai à concentration unique réalisé précédemment selon deux modes d'exposition. Dans un tel cas, il convient de procéder à un deuxième essai à concentrations multiples selon le mode d'exposition utilisé en parallèle dans l'essai à concentration unique (qui a révélé un effet nocif). Les résultats de chaque essai à concentrations multiples comportant des modes d'exposition différents permettront de déterminer le ou les modes d'exposition nocifs, de même que l'effet ou les effets qui sont fonction de la concentration.

Les sections 9 à 14 décrivent le ou les modes d'exposition à utiliser en regard de chaque méthode d'essai biologique recommandée. Pour les essais sur des plantes, des invertébrés ou des vertébrés (poissons) aquatiques, une suspension de la nouvelle substance microbienne dans l'eau d'essai constitue le principal mode d'exposition. Seul ce mode d'exposition devrait être utilisé dans les essais à concentration unique et ceux à concentrations multiples menés sur des plantes aquatiques, des invertébrés *pélagiques* ou certains organismes *épibenthiques* (comme les daphnies ou les mysidacés) (v. sections 9 et 10). Lorsque les essais à concentration unique portent sur des crevettes ou des poissons qui sont nourris pendant l'expérience, il convient d'administrer la nouvelle substance microbienne tant dans les aliments que dans l'eau (v. sections 10 et 11). Lorsque ces essais visent des invertébrés *épibenthiques* et *endobenthiques* (p. ex., *Hyalella azteca* ou larves de chironomes s'il s'agit d'eau douce; vers polychètes marins ou estuariens s'il

<sup>19</sup> Un tel essai vise à mesurer les effets d'une gamme de concentrations de la nouvelle substance microbienne administrées aux organismes d'essai d'une manière définie et uniforme. Dans un essai donné, la détermination de l'effet d'une nouvelle substance microbienne en fonction de sa concentration (et, si les calculs le permettent, d'un

paramètre comme la  $CI_{25}$  ou la  $CE_{50}$ ) ne peut se faire qu'à partir d'un seul mode d'exposition.

s'agit d'eau de mer) et qu'ils comportent un *substrat* sédimentaire et une *eau sus-jacente*, on recommande de mélanger la matière d'essai dans le sédiment et de la mettre en suspension dans l'eau sus-jacente (v. section 10).

Dans les essais à concentration unique sur des plantes terrestres, les modes d'exposition peuvent inclure un mélange de la nouvelle substance microbienne dans le *sol d'essai* et dans l'eau d'essai qui seront utilisés pendant l'expérience (v. section 12). Dans le cas d'essais à concentration unique sur des invertébrés terrestres, on peut mélanger la nouvelle substance microbienne aux aliments (s'il s'agit d'abeilles domestiques) ou dans les aliments et le sol (s'il s'agit de vers de terre) (v. section 13). Enfin, dans les essais sur des oiseaux ou de petits mammifères, le mode d'exposition retenu devrait être celui le plus susceptible d'avoir des effets pathogènes et/ou toxiques pendant ou après l'application de la nouvelle substance microbienne dans l'environnement terrestre. En conséquence, le mode d'exposition recommandé pour les essais sur des vertébrés terrestres est l'administration de la substance par *gavage* ou par inhalation (v. section 14). Tout essai sur des vertébrés terrestres ne devrait comporter qu'un seul mode d'exposition, et ce, afin que l'administration de la matière d'essai ne provoque pas un stress excessif.

Des chercheurs ont eu recours à des modes d'administration de micro-organismes à des organismes d'essai (hôtes) différents de ceux recommandés ici. Voici quelques-uns de ces modes d'exposition (Douville, 2001) :

- plantes aquatiques – lésion infligée à des *pousses* de myriophylles à épi, suivie d'une immersion des plantes dans une suspension de micro-organismes dans l'eau;
- macro-invertébrés aquatiques – injection directe (intra-hémocœlique); proie infectée donnée comme aliment;
- vertébrés aquatiques (poissons) – injection directe (intramusculaire ou intrapéritonéale) du micro-organisme; proie vivante exposée antérieurement au micro-organisme à l'étude, donnée comme aliment; abrasion dermique associée à une exposition aqueuse; *gavage*;

- plantes terrestres – lésion infligée aux feuilles, aux pédoncules ou aux *racines*, suivie d'une exposition (vaporisation ou trempage) des plantes au micro-organisme à l'étude; injection ou piquage hypodermique des feuilles ou des pédoncules; traitement des *graines*; injection de micro-organismes dans des tubercules ou des bulbes;
- invertébrés terrestres – injection directe; feuilles ou pollen infectés donnés comme aliments; proie infectée donnée comme aliment; application topique;
- vertébrés terrestres (oiseaux ou petits mammifères) – injection intrapéritonéale, intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire, intranasale ou intracérébrale; application dermique; aliments infectés.

Dans la plupart des cas, ces modes d'exposition ne sont pas recommandés pour les essais sur les effets écologiques nocifs possibles de nouvelles substances microbiennes conformément aux *Règlement sur les RSN*. Ils n'ont pas été retenus pour un certain nombre de raisons, dont les suivantes :

- (i) l'absence de « réalisme à l'échelle de l'environnement »;
- (ii) l'absence de méthodes d'essai biologique normalisées pour la mesure des effets écologiques de nouvelles substances microbiennes par le biais de tels modes d'exposition;
- (iii) des questions de rentabilité;
- (iv) l'existence de méthodes d'essai normalisées faisant appel à d'autres modes d'exposition réalistes, du point de vue environnemental, à de nouvelles substances microbiennes.

Il existe toutefois des exceptions, par exemple lorsque les méthodes d'essai biologique recommandées dans les sections 9 à 14 ne conviennent pas, auquel cas il pourrait être préférable d'utiliser des approches modifiées, comme celles décrites dans des sous-sections distinctes. Ainsi, les caractéristiques de la nouvelle substance microbienne et/ou celles de l'organisme d'essai (hôte) pourraient justifier le recours à une approche modifiée si l'on sait qu'un

effet pathogène leur est associé. Une approche modifiée pourrait inclure, le cas échéant, des lésions infligées à une espèce donnée de plante terrestre à un moment précis (et à un stade particulier de son cycle biologique) avant l'infection, ou encore l'exposition d'une partie d'une plante ou d'un stade donné de son cycle biologique autres que ceux prévus dans la méthode d'essai décrite à la sous-section 12.2.

### 3.3 Détermination et expression des concentrations ou doses expérimentales

#### Repères

- Pour des raisons d'économie, il est recommandé d'utiliser au départ une seule CDM lors des essais définitifs de pathogénicité et/ou de toxicité. Il n'est pas nécessaire de procéder à d'autres essais à des concentrations plus faibles si aucun effet nocif n'est observé à la CDM.
- Un essai à concentrations multiples, dont la plus élevée est la CDM, devrait être mené si cette dernière s'avère nocive lors d'un essai à concentration unique (ou si le responsable décide de procéder directement à un essai à concentrations multiples). Lors du choix des concentrations expérimentales, il faudrait inclure, dans la mesure du possible, des concentrations plus faibles sans effet nocif afin de pouvoir calculer, si les données le permettent, le ou les paramètres statistiques qui conviennent à un essai à concentrations multiples. On recommande de déterminer, au moyen d'un essai préliminaire, la gamme des concentrations appropriées.
- À l'exception des essais sur des vertébrés terrestres, chaque concentration expérimentale utilisée dans un essai à concentration unique ou à concentrations multiples devrait être exprimée et déclarée sous forme de nombre nominal d'unités microbiennes par millilitre ou gramme (masse sèche) de substrat d'essai dans lequel la matière d'essai est mélangée.
- Dans le cas des essais sur des oiseaux, chaque dose expérimentale, y compris la DDM, devrait être exprimée et déclarée comme suit : nombre nominal d'unités microbiennes par millilitre de suspension aqueuse de la matière d'essai administrée, multiplié par la quantité de matière d'essai consommée ou inhalée par unité de masse corporelle, multiplié par la masse de l'organisme d'essai. La ou les doses sont administrées quotidiennement pendant cinq jours consécutifs seulement, au début des essais.

- Dans le cas des essais sur des oiseaux, chaque dose expérimentale, y compris la DDM, devrait être exprimée et déclarée comme suit : nombre nominal d'unités microbiennes par millilitre de suspension aqueuse de la matière d'essai administrée, multiplié par la quantité de matière d'essai consommée ou inhalée par unité de masse corporelle, multiplié par la masse de l'organisme d'essai. La ou les doses sont administrées quotidiennement pendant cinq jours consécutifs seulement, au début des essais.

Une méthode d'essai biologique peut consister en un essai à concentration unique ou à concentrations multiples. Au départ, on procède souvent à un essai à concentration unique, c'est-à-dire la CDM de la matière d'essai (v. § 3.3.1). Selon la méthode retenue, cet essai peut inclure un ou deux modes d'exposition. Si l'on a recours à deux modes d'exposition, la CDM propre à l'essai (v. § 3.3.1) est appliquée en parallèle pour chacun de ces deux modes; il s'agit d'une approche économique visant à maximiser l'exposition. Si aucun effet nocif n'est observé en lien avec l'un et/ou l'autre mode d'exposition à la CDM, il est inutile de procéder à des essais complémentaires à des concentrations plus faibles (EC et SC, 2001). Si des effets nocifs sont observés, on recommande de procéder à un essai à concentrations multiples incluant la CDM et des concentrations plus faibles (et comportant un seul mode d'exposition) afin de déterminer la concentration seuil efficace qui influe sur le ou les paramètres biologiques mesurés (p. ex., survie, croissance, succès de reproduction, pathologies apparentes ou histologiques). Le huitième paragraphe de la sous-section 3.2 ainsi que la sous-section 3.3.2 renferment des indications sur la mise en route d'un essai à concentrations multiples.

#### 3.3.1 Essai à concentration unique et CDM (ou DDM)

La CDM de la matière d'essai devrait être utilisée pour les essais à concentration unique. La CDM se fonde sur un facteur de sécurité multiplié par la concentration la plus élevée de micro-organismes viables à laquelle des groupes d'organismes aquatiques ou terrestres pourraient être exposés dans le milieu naturel après l'application d'un produit microbien particulier à la dose maximale recommandée.

Pour déterminer la CDM, on établit la concentration de la nouvelle substance microbienne dans une

matière ou un substrat d'essai à partir du nombre d'unités microbiennes présentes dans une quantité donnée de cette matière ou de ce substrat. La définition d'une unité microbienne dépend de la nature du micro-organisme (tiré de USEPA, 1996o, avec modifications) :

- (i) *Bactérie végétative* – Une unité microbienne est un organisme viable distinct, habituellement l'entité produisant une seule unité formant colonie (UFC) sur un milieu de croissance semi-solide.
- (ii) *Mycélium fongique* – Une unité microbienne équivaut à  $10^{-9}$  g de masse sèche préparée au moyen de procédures normalisées comportant une entité viable productrice de mycélium obtenue à partir d'un milieu de croissance semi-solide.
- (iii) *Protozoaire* – Une unité microbienne est un organisme, une spore ou un kyste végétatif viable et complet de membres de diverses classes de cet embranchement.
- (iv) *Spore bactérienne ou fongique, kyste de bactérie ou de protozoaire* – Une unité microbienne est une spore ou un kyste viable et complet que l'on peut observer au microscope ou par un autre moyen. Ce terme désigne habituellement l'entité viable produisant une seule UFC sur un milieu approprié de germination. On peut en déterminer la viabilité à l'aide d'une coloration ou d'un essai de germination sur un milieu approprié.
- (v) *Virus* – Une unité microbienne est un *virion* ou un corps polyédral complet que l'on peut observer au microscope électronique. Ce terme désigne habituellement l'entité produisant une unité infectante sur des cellules ou des tissus appropriés de l'hôte.

**3.3.1.1 Administration de la CDM dans l'eau d'essai – organismes aquatiques.** L'USEPA (1996d,e,g) a mis au point une méthode normalisée utile pour le calcul et l'administration de la CDM dans l'eau, méthode applicable aux essais sur des plantes, des invertébrés et des vertébrés aquatiques. Cette méthode, également recommandée dans EC et SC (2001), permet de définir la CDM comme suit :

*La CDM est la plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes :  
10<sup>6</sup> unités/mL, ou 1000 fois la concentration prévue du micro-organisme dans l'environnement aqueux.*

Le nombre d'unités microbiennes par volume mesuré du milieu (soit  $10^6$  unités/mL) désigne la teneur en micro-organismes viables de l'eau d'essai à laquelle une quantité mesurée de la matière d'essai est ajoutée (v. § 3.4.1). Lorsqu'on ajoute à l'eau d'essai une matière d'essai sous forme de suspension (v. § 3.4.1), la teneur cible en micro-organismes viables de l'eau d'essai est de  $10^6$  unités microbiennes/mL après le mélange.

Si 1000 fois la concentration prévue de micro-organismes dans l'environnement aquatique est supérieur à  $10^6$  unités/mL (v. paragraphe précédent), c'est cette CDM qu'il faut utiliser dans les essais, à la condition qu'une telle concentration soit facilement réalisable en laboratoire<sup>20</sup> (USEPA, 1996d,e,g). Pour établir cette concentration, on multiplie par 1000 la concentration maximale calculée de micro-organismes viables qui seraient présents dans l'eau immédiatement après l'application directe d'un produit microbien dans l'environnement aquatique à la dose maximale précisée par le déclarant en regard de ce produit. Si la matière d'essai doit être mélangée à un volume donné d'eau d'essai avant le début de l'essai de pathogénicité et/ou de toxicité, il faut établir la concentration de micro-organismes viables

<sup>20</sup> L'expression « facilement réalisable en laboratoire » désigne la concentration maximale de micro-organismes pouvant être maintenue dans un système d'essai, sans que la qualité de ce dernier ne devienne inacceptable en regard des besoins des organismes d'essai. Dans les systèmes d'essai aquatique en particulier, l'emploi d'une concentration aussi élevée que la CDM peut être peu pratique, parfois, en raison de son incidence sur la qualité de l'eau, comme la baisse de la teneur en oxygène et la production de déchets métaboliques par les micro-organismes. Des concentrations excessivement élevées peuvent également avoir, sur les organismes d'essai (hôtes), des effets nocifs non spécifiques sans lien avec la pathogénicité et/ou la toxicité de la matière d'essai, ce qui peut créer de la confusion quant aux objectifs de l'étude et fausser les résultats obtenus. Toutefois, lorsque de tels effets non spécifiques peuvent « mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie humaine » (termes utilisés dans la définition de « substance toxique » dans la LCPE 1999), on devrait envisager d'utiliser une concentration aussi élevée dans les essais, particulièrement si l'espèce de micro-organisme d'essai risque de se trouver dans des conditions optimales de multiplication et de croissance dans le milieu naturel.

qui représente 1000 fois celle prévue dans l'environnement aquatique. Ce calcul se fonde sur 1000 fois la densité maximale calculée d'unités microbiennes dans une tranche d'eau de 15 cm, immédiatement après l'application directe de la PC microbienne à la dose maximale (USEPA, 1996d,e,g) et le mélange homogène réalisé tout de suite après.

Si elle est ajoutée à l'eau d'essai, la CDM de micro-organismes à laquelle les organismes sont exposés au cours d'un essai à concentration unique devrait être exprimée et déclarée sous forme de nombre nominal d'unités microbiennes par millilitre d'eau mélangé à la matière d'essai.

Il arrive fréquemment que la CDM dans l'eau d'essai, calculée selon la méthode décrite ci-dessus, soulève des problèmes en raison de ses effets nuisibles sur les organismes d'essai (hôtes), effets qui sont sans lien avec la pathogénicité et/ou la toxicité de la matière d'essai. Par exemple, dans certains essais sur des algues aquatiques, la CDM peut provoquer, sur le plan des éléments nutritifs, une compétition entre les algues et les micro-organismes viables (dont la concentration est relativement élevée) de la matière d'essai, ce qui peut inhiber la croissance des algues indépendamment de la pathogénicité et/ou de la toxicité de la matière d'essai. Si les résultats des essais préliminaires montrent que tel est le cas, on peut réduire la concentration qui sera utilisée dans un essai à concentration unique définitif à la valeur correspondant à la dose maximale d'application plutôt qu'à 1000 fois celle-ci (USEPA, 1996c). De même, dans certains essais sur des daphnies (c.-à-d. *Daphnia magna*), la CDM dans l'eau d'essai peut avoir une incidence néfaste sur la survie et/ou le succès de reproduction de celles-ci en raison de la turbidité causée par la grande quantité de micro-organismes en présence. Autre facteur de confusion, la baisse excessive de la teneur en oxygène dans un essai sur des poissons à la CDM, ce qui risque peu de se produire dans un milieu récepteur bien oxygéné. Si des essais préliminaires à la CDM mettent en lumière des problèmes qui sont sans lien avec la pathogénicité et/ou la toxicité inhérentes à la matière d'essai et qui sont peu susceptibles de « mettre en danger l'environnement essentiel pour la vie humaine » (LCPE 1999), la concentration qui sera utilisée dans un essai à concentration unique définitif peut être réduite, là encore, et passer de 1000 fois la dose maximale d'application à 10 ou 100 fois celle-ci. Une décision à cet égard pourrait être prise pendant ou

après la consultation de la DSN d'Environnement Canada (v. § 1.6.1). Une telle consultation avant la déclaration permet de discuter des facteurs de confusion propres à certains essais et de leurs incidences écologiques possibles.

**3.3.1.2 Administration de la CDM dans le sédiment d'essai – invertébrés aquatiques.** La démarche entourant l'administration de la CDM dans un *sédiment d'essai* est essentiellement la même que celle décrite précédemment pour l'*eau d'essai*. Dans le présent cas (v. les méthodes d'essai biologique recommandées aux § 10.1.3 et 10.2.3), la CDM se définit comme suit :

*La concentration de danger maximal est la plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : 10<sup>6</sup> unités/g de sédiment, ou 1000 fois la concentration prévue du micro-organisme dans l'environnement aqueux.*

Le nombre d'unités microbiennes par unité de masse du milieu (soit 10<sup>6</sup> unités/g) désigne la teneur en micro-organismes viables du *sédiment d'essai* auquel une quantité mesurée de la matière d'essai est ajoutée. Lorsqu'on ajoute au sédiment d'essai une matière d'essai (v. § 3.4.2), la teneur cible en micro-organismes viables du sédiment d'essai est de 10<sup>6</sup> unités microbiennes/g (masse sèche) après le mélange.

Si 1000 fois la concentration prévue de micro-organismes dans l'environnement aquatique est supérieur à 10<sup>6</sup> unités microbiennes/g (masse sèche) de sédiment, c'est cette CDM qu'il faut utiliser dans les essais, à la condition qu'une telle concentration soit facilement réalisable en laboratoire. Pour établir cette concentration, on multiplie par 1000 la concentration maximale calculée de micro-organismes viables qui seraient présents dans le sédiment immédiatement après l'application directe d'un produit microbien dans l'environnement aquatique à la dose maximale précisée par le déclarant en regard de ce produit. Si la matière d'essai doit être mélangée à une quantité donnée de sédiment d'essai avant le début de l'essai de pathogénicité et/ou de toxicité, il faut établir la concentration de micro-organismes viables qui représente 1000 fois celle prévue dans l'environnement aquatique. Ce calcul se fonde sur 1000 fois la densité maximale calculée d'unités

microbiennes dans une tranche de sédiment de 15 cm, immédiatement après l'application directe de la PC microbienne à sa dose maximale et le mélange homogène réalisé tout de suite après.

Si elle est ajoutée au sédiment d'essai, la CDM de micro-organismes à laquelle les organismes sont exposés au cours d'un essai à concentration unique devrait être exprimée et déclarée sous forme de nombre nominal d'unités microbiennes par gramme (masse sèche) de sédiment mélangé à la matière d'essai.

**3.3.1.3 Administration de la CDM dans les aliments d'essai – animaux aquatiques.** Certains essais à concentration unique sur des invertébrés ou des vertébrés aquatiques recommandés dans le présent guide prévoient l'administration de la matière d'essai dans le régime alimentaire et dans l'eau (v. § 10.2.2 pour les essais sur des crevettes, et § 11.1.2 et 11.2.2 pour les essais sur des poissons). L'indication suivante s'applique aux essais au cours desquels une matière d'essai est ajoutée aux aliments donnés aux organismes d'essai (hôtes) (v. § 3.2) :

*La CDM correspond à 100 fois la concentration prévue de micro-organismes dans l'environnement aquatique.*

Cette valeur, y compris la définition de la CDM dans les aliments d'essai donnés aux crevettes ou aux poissons, est conforme à celle que prescrit l'USEPA (1996e,g) pour l'administration d'une matière d'essai microbienne à des crevettes ou à des poissons dans le régime alimentaire.

Si la matière d'essai doit être mélangée à une quantité donnée d'aliments, il faut établir, conformément à la méthode décrite dans USEPA (1996e,g), la concentration de micro-organismes qui représente 100 fois celle prévue dans l'environnement aquatique. Ce calcul se fonde sur 100 fois la densité maximale estimative d'unités microbiennes dans une tranche d'eau de 15 cm, immédiatement après l'application directe dans l'eau du produit microbien à sa dose maximale et le mélange homogène réalisé tout de suite après. La sous-section 3.4.4 renferme de plus amples détails sur le mélange d'une matière d'essai et son administration dans le régime alimentaire.

**3.3.1.4 Administration de la CDM dans l'eau d'essai – plantes terrestres.** La méthode d'essai

biologique recommandée pour les essais à concentration unique sur des plantes terrestres comporte l'administration de la matière d'essai dans l'eau d'essai pulvérisée sur les plantes et le sol de chaque enceinte expérimentale, et ce, à intervalles réguliers pendant la durée de l'essai, de même que le dosage (mélange) de la matière d'essai dans le sol (une seule fois) lors de la mise en route de l'essai (v. § 12.2). La CDM administrée dans l'eau d'essai doit être conforme à celle précisée dans USEPA (1996c) et ARLA (2001) pour l'exposition de plantes terrestres. Elle se définit comme suit :

*La CDM doit équivaloir (ou ne pas être inférieure) à la concentration maximale de micro-organismes précisée par le déclarant pour le mélange final en cuve d'un produit microbien lorsqu'il est appliqué à la « dose maximale figurant sur l'étiquette ».*

La « dose maximale figurant sur l'étiquette » désigne la concentration maximale de la PC microbienne (et ses unités microbiennes par millilitre correspondantes) recommandée par le déclarant pour sa dispersion dans un porteur comme l'eau sur une superficie donnée de terre (ou d'eau dans certains cas) (USEPA, 1996c). Dans la pratique, la CDM dans l'eau d'essai à appliquer aux plantes terrestres équivaut aux unités microbiennes par millilitre (ou aux unités par gramme dans le cas de mélanges granulaires non aqueux) présentes dans le mélange final en cuve du produit microbien qui sera dispersé dans l'environnement à la dose maximale.

Pour préparer la CDM, on mélange une quantité mesurée de la matière d'essai avec une eau désionisée, cette quantité correspondant à la dose maximale figurant sur l'étiquette (v. § 3.4.1). La CDM de micro-organismes viables à laquelle les plantes terrestres sont exposées au cours d'un essai à concentration unique devrait être calculée, exprimée et déclarée sous forme de nombre nominal d'unités microbiennes par millilitre d'eau mélangé à la matière d'essai.

**3.3.1.5 Administration de la CDM dans le sol d'essai – plantes terrestres ou invertébrés endogés.** La CDM à appliquer aux plantes terrestres ou aux invertébrés endogés (p. ex., vers de terre ou collemboles) est conforme à celle prescrite dans USEPA (1996c) et ARLA (2001) pour l'administration d'une substance microbienne dans

le sol. Elle correspond également à la méthode décrite ici pour le calcul et la préparation de la CDM pour les matières d'essai administrées à des organismes aquatiques par le biais d'une eau ou d'un sédiment d'essai. Les méthodes d'essai biologique recommandées pour ces espèces sont décrites aux sous-sections 12.2 (plantes terrestres) et 13.2.2 (vers de terre).

Aux fins de la présente application, la CDM se définit comme suit :

*La CDM est la plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes :  $10^6$  unités/g de sol, ou 1000 fois la concentration prévue du micro-organisme dans l'environnement terrestre.*

Le nombre d'unités microbiennes par unité de masse du milieu (soit  $10^6$  unités/g) désigne la teneur en micro-organismes viables du *sol d'essai* auquel une quantité mesurée de la matière d'essai est ajoutée. Lorsqu'on ajoute au sol d'essai la matière d'essai, la teneur cible en micro-organismes viables du sol d'essai est de  $10^6$  unités microbiennes/g (masse sèche) après le mélange (v. § 3.4.3).

Si 1000 fois la concentration prévue de micro-organismes dans l'environnement terrestre est supérieur à  $10^6$  unités microbiennes/g (masse sèche) de sol, c'est cette CDM qu'il faut utiliser dans les essais, à la condition qu'une telle concentration soit facilement réalisable en laboratoire. Pour établir cette concentration, on multiplie par 1000 la concentration maximale calculée de micro-organismes qui seraient présents dans le sol immédiatement après l'application directe d'un produit microbien dans l'environnement terrestre à la dose maximale précisée par le déclarant en regard de ce produit. Si la matière d'essai doit être mélangée à une quantité donnée de sol d'essai avant le début de l'essai de pathogénicité et/ou de toxicité, il faut établir la concentration de micro-organismes qui représente 1000 fois celle prévue dans l'environnement terrestre. Ce calcul se fonde sur 1000 fois la densité maximale calculée d'unités microbiennes dans une tranche de sol de 15 cm, immédiatement après l'application directe de la PC microbienne à sa dose maximale et le mélange homogène réalisé tout de suite après (ARLA, 2001).

Si elle est ajoutée au sol d'essai, la CDM de micro-organismes viables à laquelle les organismes sont

exposés au cours d'un essai à concentration unique devrait être exprimée et déclarée sous forme de nombre nominal d'unités microbiennes par gramme (masse sèche) de sol mélangé à la matière d'essai.

**3.3.1.6 Administration de la CDM – invertébrés terrestres phytophiles.** La CDM à administrer à des invertébrés terrestres phytophiles (insectes foliaires ou pollinisateurs, comme les abeilles domestiques, les coccinelles ou les chrysopes vertes; v. § 13.2 et 13.3) se définit comme suit :

*La CDM doit équivaloir à 100 fois la concentration maximale de micro-organismes précisée par le déclarant pour le mélange final en cuve d'un produit microbien lorsqu'il est appliqué à la « dose maximale figurant sur l'étiquette ».*

Santé Canada (ARLA, 2001) prescrit cette valeur pour l'administration, par application topique ou dans le régime alimentaire, d'une matière d'essai microbienne à des insectes qui fréquentent le feuillage ou les pétales de plantes terrestres; cette valeur a reçu l'aval de l'USEPA (Belliveau et Vaituzis, 2001).

La CDM indiquée ci-dessus convient à l'administration de la matière d'essai à des invertébrés terrestres phytophiles selon quatre modes : régime alimentaire, application topique, immersion complète et pulvérisation (v. § 13.3). La « dose maximale figurant sur l'étiquette » désigne la concentration maximale de la PC microbienne (et ses unités microbiennes par millilitre correspondantes) recommandée par le déclarant pour sa dispersion dans un porteur comme l'eau sur une superficie donnée de terre (ou d'eau dans certains cas). Dans la pratique, la CDM à appliquer aux invertébrés terrestres phytophiles correspond aux unités microbiennes par millilitre (ou aux unités par gramme dans le cas de mélanges granulaires non aqueux) présentes dans le mélange final en cuve du produit microbien qui sera dispersé dans l'environnement à la dose maximale d'application, multiplié par un facteur de sécurité équivalant à 100 fois cette concentration (ARLA, 2001; Belliveau et Vaituzis, 2001).

La CDM de micro-organismes à laquelle les invertébrés terrestres phytophiles sont exposés au cours d'un essai à concentration unique devrait être calculée, exprimée et déclarée sous forme de nombre



nominal d'unités microbiennes par millilitre (s'il s'agit d'un mélange aqueux) ou par gramme (s'il s'agit d'un mélange granulaire non aqueux) de substrat mélangé à la matière d'essai.

**3.3.1.7 Administration de la CDM dans les aliments d'essai – invertébrés endogés.** La méthode d'essai biologique recommandée pour les vers de terre (v. § 13.2) comporte, dans le cas d'un essai à concentration unique, l'administration de la matière d'essai dans les aliments d'appoint. La CDM à utiliser dans cette application est la même que celle décrite dans la sous-section précédente (« Administration de la CDM – invertébrés terrestres phytophiles »). Les indications fournies à la sous-section 3.4.4 sont également pertinentes.

**3.3.1.8 Administration de la DDM par gavage – oiseaux.** Si une suspension aqueuse d'une matière d'essai doit être administrée par voie orale (gavage) à des oiseaux, la DDM pour cette matière (et sa suspension) se définit comme suit :

*La DDM correspond à la concentration prévue de micro-organismes (unités microbiennes/mL) dans la matière d'essai ou sa suspension aqueuse, multiplié par 5 mL/kg de masse corporelle, multiplié par la masse de l'oiseau (kg). Cette dose est administrée une fois par jour pendant les cinq premiers jours de l'essai.*

Cette valeur est conforme à celle prescrite dans USEPA (1996k) et dans ARLA (2001) pour l'administration de la DDM d'un AAM par voie orale (gavage) à des oiseaux pendant un essai de 30 jours (v. § 14.1.2); elle prend en compte le volume maximal de la suspension aqueuse qui devrait être administré en une fois (soit 5 mL/kg de masse corporelle ou, au besoin, jusqu'à 10 mL/kg; v. § 3.4.5). Si la matière d'essai est une substance solide (p. ex., une poudre), il faudra procéder à des analyses préliminaires en mélangeant dans l'eau diverses quantités de cette matière afin de déterminer la quantité à mélanger à l'eau désionisée ou distillée pour atteindre la DDM. Il est conseillé d'observer les indications fournies à la sous-section 3.4.5 sur l'administration d'une matière d'essai par voie orale (gavage) à des oiseaux ou à de petits mammifères.

**3.3.1.9 Administration de la DDM par inhalation – oiseaux.** Si une suspension aqueuse d'une matière

d'essai doit être administrée par inhalation (c.-à-d. dans les voies respiratoires par instillation nasale ou trachéale) à des oiseaux, la DDM pour cette matière (et sa suspension) se définit comme suit :

*La DDM correspond à la concentration prévue de micro-organismes (unités microbiennes/mL) dans la matière d'essai ou sa suspension aqueuse, multiplié par 0,2 mL/kg de masse corporelle, multiplié par la masse de l'oiseau (kg). Cette dose est administrée une fois par jour pendant les cinq premiers jours de l'essai.*

Cette valeur est conforme à celle prescrite dans USEPA (1996l) et dans ARLA (2001) pour l'administration de la DDM d'un AAM par inhalation à des oiseaux pendant un essai de 30 jours (v. § 14.1.2); elle prend en compte le volume maximal de la suspension aqueuse qui devrait être administré en une fois (soit au plus 0,2 mL/kg de masse corporelle; USEPA, 1996l). Si la matière d'essai est une substance solide (p. ex., une poudre), il faudra procéder à des analyses préliminaires en mélangeant dans l'eau diverses quantités de cette matière afin de déterminer la quantité à mélanger à la solution saline isotonique (v. § 3.4.6) pour atteindre la DDM. Il est conseillé d'observer les indications fournies à la section 3.4.6 sur l'administration d'une matière d'essai par inhalation à des oiseaux ou à de petits mammifères.

**3.3.1.10 Administration de la DDM par gavage – rongeurs.** Si une suspension aqueuse d'une matière d'essai doit être administrée par gavage à des rongeurs, la DDM pour cette matière (et sa suspension) se définit comme suit :

*La DDM correspond à 10<sup>8</sup> unités de la nouvelle substance microbienne, administrée sous forme de dose unique au début de l'essai.*

Cette valeur est conforme à celle prescrite dans USEPA (1996o) pour l'administration de la DDM d'un AAM par voie orale (gavage) à des rongeurs pendant un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 30 jours. Il est recommandé à la sous-section 14.2.2 du présent guide d'utiliser cette valeur, y compris pour la détermination et l'administration de la DDM. Le volume de la suspension aqueuse ne devrait pas dépasser 20 mL/kg de masse corporelle (USEPA,

1996o). Si la matière d'essai est une substance solide (p. ex., une poudre), il faudra procéder à des analyses préliminaires en mélangeant dans l'eau diverses quantités de cette matière afin de déterminer la quantité à mélanger à l'eau désionisée ou distillée pour atteindre la DDM. La sous-section 3.4.5 renferme plus de détails sur l'administration d'une matière d'essai par gavage à des oiseaux ou à de petits mammifères.

**3.3.1.11 Administration de la DDM par inhalation – rongeurs.** Si une suspension aqueuse d'une matière d'essai doit être administrée par inhalation à des rongeurs, la DDM pour cette matière (et sa suspension) se définit comme suit :

*La DDM correspond à  $10^8$  unités de la nouvelle substance microbienne, administrée sous forme de dose unique au début de l'essai.*

Cette valeur est conforme à celle prescrite dans USEPA (1996p) pour l'administration de la DDM d'un AAM par inhalation à des rongeurs pendant un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 30 jours. Il est recommandé à la sous-section 14.2.2 du présent guide d'utiliser cette valeur, y compris pour la détermination et l'administration de la DDM. Le volume de la suspension aqueuse (c.-à-d. la matière d'essai en suspension dans une solution saline isotonique; v. § 3.4.6) ne devrait pas dépasser 3,0 mL/kg de masse corporelle (USEPA, 1996p). Si la matière d'essai est une substance solide (p. ex., une poudre), il faudra procéder à des analyses préliminaires en mélangeant dans une suspension saline diverses quantités de cette matière afin de déterminer la quantité à mélanger à la solution saline isotonique pour atteindre la DDM. La sous-section 3.4.6 renferme plus de détails sur l'administration d'une matière d'essai par inhalation à des oiseaux ou à de petits mammifères.

### **3.3.2 Essai à concentrations multiples**

On peut utiliser un essai à concentrations multiples pour mesurer la *virulence* (c.-à-d. le degré de pathogénicité) et/ou la toxicité d'une nouvelle substance microbienne. Un tel essai devrait faire appel à une série de concentrations de la nouvelle substance microbienne, la plus élevée représentant la CDM ou la DDM. Pour les essais sur des plantes ou des invertébrés aquatiques ou terrestres ou sur des vertébrés aquatiques, chaque concentration

expérimentale (dont la CDM) devrait être exprimée et déclarée sous forme de nombre nominal d'unités microbiennes par millilitre ou gramme (masse sèche) de substrat d'essai auquel la matière d'essai est mélangée (v. § 3.3.1). La DDM et les doses plus faibles d'une matière d'essai administrée par voie orale ou par inhalation à des oiseaux devraient être exprimées et déclarées sous forme de nombre nominal d'unités microbiennes consommées ou inhalées par unité (kg) de masse corporelle, et ce, pour chaque administration quotidienne (v. § 3.3.1). Dans le cas de rongeurs, ces doses devraient être exprimées et déclarées sous forme de nombre nominal d'unités microbiennes administrées dans une dose unique au début de l'essai (v. § 3.3.1).

Il est recommandé d'utiliser une série logarithmique de concentrations pour établir une gamme de concentrations expérimentales suffisamment étendue pour permettre de détecter les effets nocifs attribuables aux toxiques (endotoxines, métabolites toxiques ou autres substances non biologiques) associées à la nouvelle substance microbienne (v. annexe D). La gamme de concentrations (ou doses) retenue devrait permettre de calculer les paramètres statistiques appropriés (p. ex.,  $CL_{50}$  ou  $DL_{50}$ ,  $CE_{50}$  ou  $DE_{50}$ ,  $CI_{25}$  ou  $DI_{25}$ ,  $CSEO/CMEO$  ou  $DSEO/DMEO$ ). On devrait consulter le guide des méthodes statistiques applicables aux essais monospécifiques sur les effets nocifs de contaminants environnementaux, publié par Environnement Canada (2004d), avant de choisir les concentrations expérimentales à inclure dans un essai à concentrations multiples et de calculer les paramètres statistiques appropriés.

Si l'effet ou les effets nocifs observés au cours d'un essai à concentration unique à la CDM ou à la DDM sont causés par la pathogénicité de la nouvelle substance microbienne, il y a de fortes chances que la réaction à des concentrations (doses) plus faibles puisse être représentée par une courbe effet-log(concentration) [ou effet-log(dose) dans le cas d'essais sur des oiseaux ou de petits mammifères] comme celle que l'on obtient habituellement avec une substance chimique toxique (v. section 2). Cela étant, il est également fort possible que des paramètres statistiques comme la  $CL_{50}$ , la  $DL_{50}$ , la  $CE_{50}$ , la  $DE_{50}$ , la  $CI_p$ , la  $DI_p$ , la  $CSEO/CMEO$  ou la  $DSEO/DMEO$ , qui sont souvent calculés lors des essais à concentrations multiples faisant appel à des substances toxiques, ne puissent être établis. Il n'en

demeure pas moins qu'un essai à concentrations multiples est utile dans tous les cas où des effets nocifs sont évidents à la CDM ou à la DDM. En effet, un tel essai permet de déterminer la réaction des organismes d'essai à une série graduée (p. ex., logarithmique) de concentrations (doses) expérimentales plus faibles, de même que la mesure dans laquelle de faibles concentrations de la nouvelle substance microbienne susceptible d'être présente dans l'environnement exercent un effet néfaste.

Au cours des préparatifs entourant un essai à concentrations multiples définitif, on recommande d'établir, au moyen d'un essai préliminaire, la gamme des concentrations qui conviendra à l'essai définitif. En général, cet essai préliminaire englobe une vaste gamme de concentrations expérimentales (p. ex., chaque concentration d'une série diffère de la suivante par un ordre de grandeur). Les résultats d'un tel essai révèlent les types d'effets nocifs associés à la nouvelle substance microbienne et permettent de déterminer si ces effets obéissent à une relation effet-log(concentration). Les concentrations expérimentales de l'essai définitif devraient être choisies en fonction de ces résultats.

### 3.4 Préparation et administration des concentrations expérimentales

Pour préparer les concentrations de la matière d'essai qui sera administrée, selon une méthode d'essai biologique donnée, à des plantes, invertébrés ou vertébrés aquatiques ou terrestres, il convient de suivre des procédures dont le degré de normalisation et de similitude est le plus élevé possible afin que des comparaisons utiles puissent être établies. Toutefois, comme le ou les modes d'exposition (eau, sédiment, sol, aliments, gavage ou inhalation) varient selon le type d'organisme d'essai et la méthode d'essai biologique à appliquer (§ 3.2), les procédures de préparation et d'administration des concentrations ou doses expérimentales varient également selon le substrat d'essai auquel sera mélangée la matière d'essai, de même que selon la nature de la matière d'essai (p. ex., liquide ou poudre) et son comportement une fois mélangée à un substrat d'essai (eau, sédiment, sol, aliments) ou administrée par gavage ou par inhalation.

Les sous-sections qui suivent portent sur la préparation et l'administration de divers types de matières d'essai mélangées à des substrats d'essai

donnés (eau, sédiment, sol ou aliments), y compris l'administration par gavage ou par inhalation (s'il s'agit d'oiseaux ou de petits mammifères). La sous-section 4.13.1, « Essais sur des substances présentant des difficultés », de EC (1999b) renferme de plus amples indications sur le mélange et l'administration de substances aux propriétés particulières (p. ex., faible solubilité dans l'eau, tendance à la sorption, volatilité, instabilité), lesquelles peuvent s'appliquer à certaines matières d'essai.

#### 3.4.1 Mélange et administration dans l'eau

##### **Repères**

- *L'eau d'essai à laquelle une matière d'essai est mélangée doit être exempte de contaminants; ses caractéristiques physicochimiques doivent convenir à une utilisation comme eau témoin/de dilution dans la méthode d'essai biologique envisagée.*
- *On devrait préparer chaque concentration expérimentale en mélangeant une quantité mesurée de la matière d'essai à un volume d'eau d'essai qui suffira à toutes les répétitions de la concentration à inclure dans l'essai.*
- *Aucun solvant autre que l'eau d'essai ne doit être utilisé. Il faut également éviter d'avoir recours, lors de la préparation et du mélange de la matière d'essai avec l'eau d'essai, à la dispersion par ultrasons ou à d'autres procédures susceptibles d'avoir une incidence sur la nouvelle substance microbienne.*
- *On recommande de procéder au mélange suffisamment à l'avance (quelques minutes jusqu'à 24 h avant le début de l'essai) pour assurer une répartition homogène de la matière d'essai. Après le mélange, chaque concentration expérimentale et le ou les traitements témoins doivent être transférés dans les enceintes expérimentales aux fins de la mise en route de l'essai ou du renouvellement des suspensions/solutions.*
- *Lorsque les essais comportent le renouvellement intermittent des concentrations expérimentales (y compris les témoins), il faut préparer un ensemble frais de ces concentrations pour chaque renouvellement.*

L'eau douce, l'eau d'estuaire ou l'eau de mer servant d'eau d'essai<sup>21</sup> doit être exempte de contaminants. Le

<sup>21</sup> Selon la méthode d'essai biologique utilisée, cette eau peut provenir d'une source non contaminée ou être

laboratoire d'essai devrait connaître ses caractéristiques physicochimiques de base (p. ex., pH, dureté ou salinité, oxygène dissous, solides en suspension, ammoniac, nitrite, métaux dissous, pesticides) avant de la choisir comme eau d'essai d'une méthode biologique particulière portant sur une nouvelle substance microbienne. L'eau d'essai *non contaminée* doit aussi convenir aux fins de la méthode d'essai, c'est-à-dire permettre que les groupes *témoins négatifs* soient conformes aux critères de validité propres à l'essai et ne pas avoir d'effets nocifs discernables sur les organismes d'essai. Elle peut soit provenir d'une source naturelle appropriée, soit être préparée en laboratoire (eau artificielle) afin que certaines caractéristiques comme la dureté (s'il s'agit d'eau douce), la salinité (s'il s'agit d'eau d'estuaire ou d'eau de mer) et le pH soient conformes aux exigences de l'essai.

Dans le cas d'un essai à concentration unique comportant l'ajout d'une nouvelle substance microbienne à l'eau d'essai (v. § 3.2 et sections 9 à 14), il faut mélanger soigneusement une quantité mesurée (volume ou masse) de la matière d'essai représentant la CDM (§ 3.3.1) avec un volume convenable d'eau d'essai. Le mélange peut se faire à la main (p. ex., avec une spatule ou une tige en verre propre) ou à l'aide d'un appareil mécanique (p. ex., un barreau aimanté revêtu de Teflon<sup>MD</sup> dans le récipient contenant l'eau d'essai, ou, pour des quantités plus élevées, un agitateur-mélangeur vortex en acier inoxydable dans un seau en plastique ou une autre enceinte non toxique contenant l'eau d'essai). La CDM et chacune des concentrations plus faibles utilisées dans un essai à concentrations multiples devraient être préparées de la même façon, une à la fois<sup>22</sup>.

Dans le cas d'essais sur des organismes aquatiques, il faut tenir compte du nombre d'enceintes expérimentales de répétition requises pour chaque traitement (concentration) faisant partie de la méthode d'essai biologique à appliquer (v. sections 9 à 11) lorsqu'on détermine la quantité de chaque

concentration expérimentale dont on a besoin, et prévoir un excédent d'au moins 10 %. Une fois le mélange réalisé, il faut transférer une aliquote mesurée de chaque concentration expérimentale dans chacune des enceintes expérimentales de répétition. L'exposition des organismes d'essai à ces suspensions fraîchement préparées doit débuter dès cet instant (p. ex., s'il s'agit de mettre en route un essai sur des plantes aquatiques ou des poissons ou de renouveler des concentrations expérimentales) ou le jour suivant (p. ex., dans le cas de la mise en route d'un essai sur des amphipodes ou des larves de chironomes), conformément aux procédures propres à la méthode d'essai biologique (v. sections 9 à 11). Au besoin, la suspension dans chaque enceinte de mélange peut être agitée de nouveau juste avant le prélèvement de chaque aliquote.

Chaque concentration expérimentale devrait être mélangée soigneusement, avec la turbulence et pendant le temps qu'il faut pour obtenir une suspension homogène de la matière d'essai dans l'eau d'essai. Il ne faut pas utiliser de solvant (autre que l'eau d'essai) pour préparer une concentration expérimentale, étant donné qu'il pourrait être toxique pour la nouvelle substance microbienne ou avoir des effets toxiques (directs ou indirects) sur les organismes d'essai. En outre, lorsqu'on tente d'obtenir une suspension homogène au cours de la préparation de la ou des concentrations expérimentales, il faut éviter d'avoir recours à une procédure telle la dispersion par ultrasons, qui est susceptible d'être nocive pour la nouvelle substance microbienne. Pendant le mélange, la température devrait être la même pour chaque traitement; il est conseillé de la maintenir assez basse afin de réduire au minimum ses effets sur la nouvelle substance microbienne. On recommande de procéder au mélange suffisamment à l'avance (quelques minutes jusqu'à 24 h avant le début de l'essai) pour assurer une répartition homogène de la matière d'essai. La procédure ayant servi à préparer le ou les *traitements d'essai* doit également servir au mélange de chaque traitement témoin faisant partie d'un essai (v. section 4).

---

préparée en laboratoire. Dans certains cas (c.-à-d. les essais sur des organismes terrestres), il s'agit d'eau désionisée.

<sup>22</sup> Il n'est pas recommandé de préparer une suspension mère, puis d'en ajouter des aliquotes mesurées à l'eau d'essai aux fins d'un essai à concentrations multiples. Selon la nature de la matière d'essai, y compris sa granulométrie, une telle procédure pourrait générer des erreurs appréciables.

La procédure suivante est recommandée pour la préparation de suspensions aqueuses de matières d'essai susceptibles d'être hydrophobes ou d'exiger une agitation vigoureuse<sup>23</sup>. Mesurer 50 g (ou une

---

<sup>23</sup> Cette procédure correspond à la méthode 966.23B de AOACI (2000). Même si elle est prescrite pour la

quantité proportionnellement plus élevée ou moins élevée) de la matière d'essai dans un bocal stérile de mélangeur. Ajouter 450 mL (ou un volume proportionnellement plus élevé ou moins élevé) de diluant (eau douce, eau de mer ou solution saline isotonique). Mélanger pendant 2 minutes dans un mélangeur à grande vitesse, à 10 000–12 000 tr/min. On peut aussi utiliser un Stomacher<sup>MD</sup>. Il ne doit pas s'écouler plus de 15 minutes entre le mélange de chaque suspension d'essai et le transfert dans les enceintes expérimentales.

Pendant les essais sur des plantes ou des invertébrés aquatiques ou sur des poissons où il est possible de renouveler l'eau d'essai, il faut renouveler chaque concentration (et chaque traitement témoin) aux intervalles précisés pour ces essais (v. sections 9 à 11). C'est ce qu'on appelle un *renouvellement intermittent*. Il faut préparer une ou des concentrations expérimentales fraîches pour chaque renouvellement. La procédure utilisée (y compris pour les témoins) doit être la même que celle employée lors de la mise en route de l'essai (c.-à-d. pour l'exposition initiale).

### 3.4.2 Mélange et administration dans le sédiment

#### Repères

- *Le sédiment d'essai auquel une matière d'essai est mélangée doit être exempt de contaminants; ses caractéristiques physicochimiques doivent convenir à une utilisation comme sédiment témoin négatif dans la méthode d'essai biologique envisagée.*
- *On devrait préparer chaque concentration expérimentale en mélangeant une quantité mesurée de la matière d'essai à une quantité de sédiment d'essai qui suffira à toutes les répétitions de la concentration à inclure dans l'essai.*
- *Aucun solvant (autre que l'eau d'essai servant à diluer, avant le mélange, la matière d'essai) ne doit être utilisé pour préparer la ou les concentrations expérimentales de la nouvelle substance microbienne à mélanger au sédiment d'essai.*

- *Les procédures utilisées pour préparer chaque concentration expérimentale et chaque témoin et pour mélanger la matière d'essai au sédiment d'essai doivent être identiques.*
- *On recommande de procéder au mélange suffisamment à l'avance (quelques minutes jusqu'à 24 h avant le début de l'essai) pour assurer une répartition homogène de la matière d'essai. Après le mélange, chaque concentration expérimentale et le ou les traitements témoins doivent être transférés dans les enceintes expérimentales, et l'essai doit être mis en route dans les 24 h qui suivent.*

Le sédiment d'eau douce, d'estuaire ou de mer servant de *sédiment d'essai* doit être exempt de contaminants. Le laboratoire devrait connaître ses caractéristiques physicochimiques de base (p. ex., sédiment entier – granulométrie, teneur en eau et teneur en carbone organique total; *eau de porosité* – pH, ammoniac, salinité/dureté, métaux dissous et pesticides) avant de le choisir comme sédiment d'essai d'une méthode d'essai biologique particulière portant sur une nouvelle substance microbienne. Le sédiment d'essai *non contaminé* doit aussi convenir aux fins de la méthode d'essai, c'est-à-dire permettre que les groupes *témoins négatifs* soient conformes aux critères de validité propres à l'essai et ne pas avoir d'effets nocifs discernables sur les organismes d'essai. Il peut soit provenir d'une source naturelle appropriée, soit être préparé en laboratoire (sédiment artificiel) afin que certaines caractéristiques comme la granulométrie, la salinité de l'eau de porosité (s'il s'agit d'un sédiment d'estuaire ou de mer) et le pH de l'eau de porosité soient conformes aux exigences de l'essai. Pour les essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne, on accordera la préférence à un sédiment naturel (plutôt qu'artificiel) *non contaminé* aux propriétés adéquates (dont la granulométrie et la teneur en carbone organique) s'il est possible de l'obtenir. Il n'est pas recommandé d'utiliser un sédiment stérile (naturel ou artificiel), car la plupart des procédés de stérilisation en altèrent les caractéristiques physicochimiques.

Dans le cas d'un essai à concentration unique comportant l'ajout d'une nouvelle substance microbienne à un sédiment d'essai (v. § 3.2 et section 10), il faut mélanger soigneusement une quantité mesurée (volume ou masse) de la matière d'essai représentant la CDM (§ 3.3.1) avec une

---

préparation de suspensions d'aliments dans l'eau, elle convient également à la préparation de suspensions microbiennes dans l'eau.

quantité appropriée de *sédiment d'essai*<sup>24</sup>. La CDM et chacune des concentrations plus faibles utilisées dans un essai à concentrations multiples devraient être préparées de la même façon, une à la fois. Le mélange peut se faire à la main (p. ex., avec une cuiller en plastique ou en acier inoxydable) ou à l'aide d'un appareil mécanique (p. ex., un rouleau lisse). On trouvera des indications pertinentes sur la préparation des mélanges de matières d'essai et de sédiments dans chacune des méthodes d'essai biologique recommandées faisant appel à un sédiment (v. section 10). Le *Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques* (EC, 1994) renferme également des conseils pratiques.

Il faudrait tenir compte du nombre d'enceintes expérimentales de répétition requises pour chaque traitement (concentration) faisant partie de la méthode d'essai biologique à appliquer (v. section 10) lorsqu'on détermine la quantité de chaque concentration expérimentale dont on a besoin, et prévoir un excédent d'au moins 10 %. Une fois le mélange réalisé, il faut transférer une aliquote mesurée de chaque concentration expérimentale dans chacune des enceintes expérimentales de répétition. L'exposition des organismes d'essai doit débuter le jour suivant, à moins que la méthode d'essai biologique à appliquer ne précise un autre délai (v. section 10).

Chaque concentration expérimentale devrait être mélangée soigneusement, pendant le temps qu'il faut pour obtenir une dispersion homogène de la matière d'essai dans le sédiment d'essai. La procédure et la durée du mélange devraient être les mêmes pour chaque concentration expérimentale et chaque témoin. Il ne faut pas utiliser de solvant (autre que l'eau d'essai) pour préparer une concentration expérimentale, étant donné qu'il pourrait être toxique pour la nouvelle substance microbienne ou avoir des effets toxiques (directs ou indirects) sur les organismes d'essai. En outre, lorsqu'on tente

d'obtenir une suspension homogène au cours de la préparation de la ou des concentrations expérimentales, il faut éviter d'avoir recours à des procédures susceptibles d'être nocives pour la nouvelle substance microbienne. Ainsi, pendant le mélange, il est conseillé de maintenir la température assez basse afin de réduire au minimum tout effet thermique sur la nouvelle substance microbienne et toute modification des caractéristiques physicochimiques du mélange. On recommande de procéder au mélange suffisamment à l'avance (quelques minutes jusqu'à 24 h avant le début de l'essai) pour assurer une répartition homogène de la matière d'essai. Il est conseillé d'analyser des sous-échantillons du mélange afin de déterminer les concentrations de la nouvelle substance microbienne et le degré de mélange et d'homogénéité atteint. La procédure ayant servi à préparer le ou les traitements d'essai doit également servir au mélange de chaque traitement témoin (v. section 4).

### 3.4.3 Mélange et administration dans le sol

#### Repères

- *Le sol d'essai auquel une matière d'essai est mélangée doit être exempt de contaminants; ses caractéristiques physicochimiques doivent convenir à une utilisation comme sol témoin négatif dans la méthode d'essai biologique envisagée.*
- *On devrait préparer chaque concentration expérimentale en mélangeant une quantité mesurée de la matière d'essai à une quantité de sol d'essai qui suffira à toutes les répétitions de la concentration à inclure dans l'essai.*
- *Aucun solvant (autre que l'eau d'essai servant à diluer, avant le mélange, la matière d'essai) ne doit être utilisé pour préparer la ou les concentrations expérimentales de la nouvelle substance microbienne à mélanger au sol d'essai.*
- *Les procédures utilisées pour préparer chaque concentration expérimentale et chaque témoin et pour mélanger la matière d'essai au sol d'essai doivent être identiques.*
- *On recommande de procéder au mélange suffisamment à l'avance (quelques minutes jusqu'à 24 h avant le début de l'essai) pour assurer une répartition homogène de la matière d'essai. Après le mélange, chaque concentration expérimentale et le ou les traitements témoins doivent être transférés dans les enceintes expérimentales, et l'essai doit être mis en route dans les 24 h qui suivent.*

<sup>24</sup> Pour obtenir une ou plus d'une concentration expérimentale donnée, on peut mélanger, au besoin, une quantité mesurée de la matière d'essai dans un volume approprié d'eau d'essai à des fins de dilution avant de procéder au mélange avec une quantité donnée de sédiment d'essai. Dans un tel cas, il faut tenir compte de cette dilution dans le calcul final de chaque concentration nominale de la matière d'essai mélangée au sédiment d'essai.

Le sol servant de *sol d'essai* doit être exempt de contaminants. Le laboratoire devrait connaître ses caractéristiques physicochimiques de base (p. ex., granulométrie, teneur en eau, teneur en carbone organique, pH, métaux, pesticides, hydrocarbures pétroliers) avant de le choisir comme sol d'essai d'une méthode d'essai biologique particulière portant sur une nouvelle substance microbienne. Le sol d'essai *non contaminé* doit aussi convenir aux fins de la méthode d'essai, c'est-à-dire permettre que les groupes témoins négatifs inclus dans l'essai soient conformes aux critères de validité propres à l'essai et ne pas avoir d'effets nocifs discernables sur les organismes d'essai. Il peut soit provenir d'une source naturelle appropriée, soit être préparé en laboratoire (sol artificiel) afin que certaines caractéristiques comme la granulométrie, la teneur en eau, la teneur en carbone organique et le pH soient conformes aux exigences de l'essai. Le choix du sol d'essai dépend des caractéristiques physicochimiques exigées ou recommandées dans la méthode d'essai biologique à appliquer au moyen d'une matière d'essai mélangée à un sol utilisé comme substrat d'essai (v. sections 12 et 13). Pour les essais portant sur une nouvelle substance microbienne, on accordera la préférence à un sol naturel (plutôt qu'artificiel) *non contaminé* aux propriétés adéquates (dont la granulométrie et la teneur en carbone organique) s'il est possible de l'obtenir. Si un sol artificiel doit être utilisé, il est recommandé de le préparer selon les indications fournies dans EC (2004a,b,c), de même que dans ISO (1998, 1999b) et OCDE (2000c). Il n'est pas recommandé d'utiliser un sol stérile (naturel ou artificiel)<sup>25</sup>.

Dans le cas d'un essai à concentration unique comportant l'ajout d'une nouvelle substance microbienne à un sol d'essai (v. § 3.2 et sections 12 et 13), il faut mélanger soigneusement une quantité mesurée (volume ou masse) de la matière d'essai

<sup>25</sup> La stérilisation en autoclave peut occasionner des rejets de composants toxiques susceptibles d'avoir des effets défavorables sur les organismes d'essai (hôtes) ou de fausser les résultats. En outre, certains micro-organismes d'essai introduits dans un sol stérilisé peuvent atteindre des niveaux de population anormalement élevés que l'on n'observe pas dans le cas de populations naturelles de micro-organismes dans un sol non stérilisé. La stérilisation d'un sol d'essai n'est pas recommandée du fait que ce procédé supprimerait les micro-organismes endémiques dans le sol, lesquels pourraient, autrement, influencer sur les micro-organismes d'essai présents dans une nouvelle substance microbienne en inhibant leur multiplication et leur croissance.

représentant la CDM (§ 3.3.1) avec un volume convenable de *sol d'essai*<sup>26</sup>. La CDM et chacune des concentrations plus faibles utilisées dans un essai à concentrations multiples devraient être préparées de la même façon, une à la fois. Le mélange peut se faire à la main (p. ex., avec une cuiller en plastique ou en acier inoxydable) ou à l'aide d'un appareil mécanique (p. ex., un rouleau lisse). On trouvera des indications pertinentes sur la préparation des mélanges de matières d'essai et de sol dans chacune des méthodes d'essai biologique recommandées faisant appel à un sol comme substrat d'essai (v. sections 12 et 13).

Il faudrait tenir compte du nombre d'enceintes expérimentales de répétition requises pour chaque traitement (concentration) faisant partie de la méthode d'essai biologique à appliquer (v. sections 12 et 13) lorsqu'on détermine la quantité de chaque concentration expérimentale dont on a besoin, et prévoir un excédent d'au moins 10 %. Une fois le mélange réalisé, il faut transférer une aliquote mesurée de chaque concentration expérimentale dans chacune des enceintes expérimentales de répétition. L'exposition des organismes d'essai doit débiter le jour suivant, à moins que la méthode d'essai biologique à appliquer ne précise un autre délai (v. sections 12 et 13).

Chaque concentration expérimentale devrait être mélangée soigneusement, pendant le temps qu'il faut pour obtenir une dispersion homogène de la matière d'essai dans le sol d'essai. La procédure et la durée du mélange devraient être les mêmes pour chaque concentration expérimentale et chaque témoin. Il ne faut pas utiliser de solvant (autre que l'eau d'essai) pour préparer une concentration expérimentale, étant donné qu'il pourrait être toxique pour la nouvelle substance microbienne ou avoir des effets toxiques (directs ou indirects) sur les organismes d'essai. En outre, lorsqu'on tente d'obtenir une suspension homogène au cours de la préparation de la ou des concentrations expérimentales, il faut éviter d'avoir recours à des procédures susceptibles d'être nocives pour la nouvelle substance microbienne. Ainsi, pendant le mélange, il est conseillé de maintenir la

<sup>26</sup> Pour obtenir une ou plus d'une concentration expérimentale donnée, on peut mélanger, au besoin, une quantité mesurée de la nouvelle substance microbienne dans un volume approprié d'*eau d'essai* à des fins de dilution avant le mélange à un volume mesuré de *sol d'essai*. Dans un tel cas, il faut tenir compte de cette dilution dans le calcul final de chaque concentration nominale de la matière d'essai mélangée au sol d'essai.

température assez basse afin de réduire au minimum tout effet thermique sur la nouvelle substance microbienne et toute modification des caractéristiques physicochimiques du mélange. On recommande de procéder au mélange suffisamment à l'avance (quelques minutes jusqu'à 24 h avant le début de l'essai) pour assurer une répartition homogène de la matière d'essai. Il est conseillé d'analyser des sous-échantillons du mélange afin de déterminer les concentrations de la nouvelle substance microbienne et le degré de mélange et d'homogénéité atteint. La procédure ayant servi à préparer le ou les traitements d'essai doit également servir au mélange de chaque traitement témoin (v. section 4).

#### 3.4.4 *Mélange et administration dans les aliments*

##### **Repères**

- *On devrait préparer chaque concentration expérimentale d'une nouvelle substance microbienne administrée dans les aliments en mélangeant une quantité mesurée de la matière d'essai aux aliments, et ce, quotidiennement pendant le nombre de jours prévus dans l'essai.*
- *Les conditions dans lesquelles les aliments requis pour chaque traitement (concentration), dont les témoins, sont mélangés doivent être identiques (y compris la durée et la température).*
- *Aucun solvant (autre que l'eau d'essai servant à diluer, avant le mélange, la matière d'essai) ne doit être utilisé pour préparer la ou les concentrations expérimentales de la nouvelle substance microbienne à mélanger aux aliments.*
- *Avant de mettre fin à la procédure de mélange, il est recommandé de procéder à des analyses préliminaires de sous-échantillons pour en vérifier l'homogénéité.*

Dans certains essais sur des crevettes (§ 10.2.2), des poissons (§ 11.1.2 et 11.2.2) ou des invertébrés terrestres (section 13), on expose les organismes à la matière d'essai mélangée aux aliments. Le type d'aliment est fonction du type d'essai. Dans le cas des crevettes ou des poissons, des aliments du commerce (flocons ou boulettes)<sup>27</sup> de la taille appropriée sont donnés au début de l'essai et pendant celui-ci

<sup>27</sup> Afin de réduire au minimum la perte de matière d'essai présente dans les aliments ajoutés à l'eau, il est préférable de mélanger cette matière aux flocons, puis d'en faire des boulettes.

(USEPA, 1996e,g). Lors d'un essai sur les effets d'une nouvelle substance microbienne sur la survie et la croissance de vers de terre par suite d'une exposition prolongée, on devrait incorporer une quantité mesurée de la matière d'essai dans le bolus de gruaux ajouté aux enceintes expérimentales de répétition au début de l'essai et pendant celui-ci (EC, 2004b). Si l'essai fait appel à des abeilles domestiques, celles-ci devraient être exposées par voie orale (USEPA, 1996j) à la matière d'essai mélangée à une solution de saccharose (OCDE, 1998d). Les sous-sections 10.2.2, 11.1.2, 11.2.2 et 13.2 renferment des indications sur la fréquence de l'alimentation durant chacun de ces essais, de même que des renseignements propres à chaque essai.

Dans des cas choisis, la matière d'essai destinée à des oiseaux ou à des rongeurs peut être incorporée dans les aliments plutôt qu'administrée par voie orale (gavage) (v. § 3.4.5) ou par inhalation (§ 3.4.6). Si cette forme d'administration est réalisable et appropriée (particulièrement pour les études sur les effets chroniques), la matière d'essai doit satisfaire aux critères suivants : (i) être sapide et ne pas perturber l'ingestion journalière et normale d'aliments; (ii) être incorporée dans la ration normale et ne pas avoir d'effets néfastes sur la qualité des aliments ou la stabilité de la matière d'essai.

Lors de la préparation de la ou des concentrations expérimentales, une quantité mesurée de la matière d'essai devrait être mélangée aux aliments, conformément aux indications fournies à la sous-section 3.3. La procédure à utiliser pour ce mélange est fonction de la nature tant de la matière d'essai (p. ex., suspension aqueuse, poudre ou solide granulé) que de l'aliment lui-même. Pour normaliser la procédure de mélange à utiliser dans un essai, il est recommandé de procéder à des analyses préliminaires de sous-échantillons afin de déterminer la teneur en substance microbienne de l'aliment (v. § 3.5) et de confirmer que la procédure convient et que le mélange est homogène.

Lors du mélange de la matière d'essai aux aliments, il faudrait tenir compte du nombre de répétitions de chaque traitement (concentration) et de la fréquence d'alimentation précisée dans la méthode d'essai biologique (v. sections 11 et 13) lorsqu'on détermine la quantité de chaque concentration expérimentale, et prévoir un excédent d'au moins 10 %. Ce mélange devrait être préparé le jour où il est utilisé.



Chaque concentration expérimentale devrait être mélangée soigneusement, pendant le temps qu'il faut pour obtenir une répartition homogène de la nouvelle substance microbienne dans le lot d'aliments. La procédure et la durée du mélange devraient être les mêmes pour chaque concentration expérimentale et chaque témoin. Il ne faut pas utiliser de solvant (autre que l'eau d'essai) pour préparer une concentration expérimentale, étant donné qu'il pourrait être toxique pour la nouvelle substance microbienne ou avoir des effets toxiques (directs ou indirects) sur les organismes d'essai. En outre, lorsqu'on tente d'obtenir un mélange homogène au cours de la préparation de la ou des concentrations expérimentales, il faut éviter d'avoir recours à des procédures susceptibles d'être nocives pour la nouvelle substance microbienne. Ainsi, pendant le mélange, il est conseillé de maintenir la température assez basse afin de réduire au minimum tout effet thermique sur la nouvelle substance microbienne et toute modification des caractéristiques physicochimiques du mélange. On recommande de procéder au mélange suffisamment à l'avance (quelques minutes jusqu'à quelques heures avant le début de l'essai) pour assurer une répartition homogène de la matière d'essai. La procédure ayant servi à préparer le ou les traitements d'essai doit également servir au mélange de chaque traitement témoin (v. section 4).

#### 3.4.5 Administration par voie orale (gavage)

##### **Repères**

- *Des précautions particulières s'imposent lors de l'administration d'une matière d'essai à des oiseaux ou à de petits mammifères par voie orale (gavage).*
- *Il est recommandé d'utiliser une canule à bout arrondi.*
- *Si la matière d'essai est un solide, elle devrait être administrée par gavage sous forme de suspension aqueuse, ou encore de capsules de gélatine.*
- *Il est préférable de n'utiliser aucun solvant (autre que l'eau d'essai servant à diluer, avant le mélange, la matière d'essai) pour préparer la ou les concentrations expérimentales de la nouvelle substance microbienne administrée par gavage. Si la matière d'essai est hydrophobe, on peut se servir d'huile de maïs ou de carboxyméthylcellulose.*

- *Le ou les groupes témoins doivent recevoir la même quantité de liquide ou de suspension aqueuse par gavage que les animaux d'essai recevant la DDM sous forme de suspension.*

L'exposition par voie orale (gavage) à une nouvelle substance microbienne constitue l'un des modes que l'on préconise d'utiliser lors d'essais sur des oiseaux ou de petits mammifères (USEPA, 1996b,k,m,o,t,u) (v. § 3.2 et section 14). Il est recommandé d'employer une canule à bout arrondi (USEPA, 1996b) afin de ne pas blesser les animaux d'essai. La sous-section 3.3.1 décrit la façon de calculer la quantité de matière d'essai à administrer à chaque animal faisant partie du *traitement de répétition* afin d'atteindre la DDM (ou des doses plus faibles dans le cas d'essais à concentrations multiples). Pour les oiseaux, le volume maximal est généralement de 5,0 mL/kg de masse corporelle (USEPA, 1996b,k), mais il peut aller jusqu'à 10,0 mL/kg, au besoin, pour atteindre la DDM. Dans le cas des rongeurs, le volume ne devrait pas dépasser 20,0 mL/kg de masse corporelle (USEPA, 1996o).

Les méthodes d'essai recommandées pour l'administration d'une matière d'essai par gavage prévoient une dose par jour pendant les cinq premiers jours des essais sur des oiseaux (§ 14.1.2) et une seule dose au début des essais sur des rongeurs (§ 14.2.2). Pendant chaque exposition, il faut administrer chaque traitement témoin selon la procédure ayant servi à administrer la ou les doses d'essai par gavage (v. section 4). Dans tous les cas, il faut veiller à ne pas causer un stress excessif chez les organismes d'essai ou les blesser (§ 7.2). Les techniques de manipulation et les procédures de canulation devraient être identiques pour tous les animaux.

Si la matière d'essai est une suspension liquide, la quantité de matière nécessaire pour atteindre la ou les doses d'essai peut être administrée directement par gavage ou mise en suspension dans un volume approprié d'eau d'essai (v. § 3.4.1). Si la matière d'essai est un solide, elle devrait être mise en suspension dans l'eau d'essai (eau désionisée) pour en faciliter l'administration. On peut aussi l'administrer sous forme de capsules de gélatine. Le ou les groupes témoins doivent recevoir la même

quantité de liquide ou de suspension aqueuse<sup>28</sup> par gavage que les animaux d'essai recevant la DDM sous forme de suspension aqueuse.

Sauf si la matière d'essai est hydrophobe, il ne faut pas utiliser de solvant (autre que l'eau d'essai) pour préparer une concentration expérimentale, car il pourrait être toxique pour la nouvelle substance microbienne ou avoir des effets toxiques (directs ou indirects) sur les organismes d'essai. S'il faut employer un solvant autre que l'eau d'essai (p. ex., en raison de la nature hydrophobe ou d'autres propriétés de la matière d'essai), on peut se servir d'huile de maïs ou de carboxyméthylcellulose pour obtenir une suspension aux fins du dosage. Le ou les groupes témoins doivent recevoir la même quantité de solvant que celle utilisée pour administrer la DDM.

Certains produits microbiens sont visqueux ou renferment des quantités proportionnellement élevées de porteurs inorganiques ou organiques. Dans de tels cas, on conseille au responsable de l'essai d'administrer aux oiseaux ou aux rongeurs la nouvelle substance microbienne elle-même plutôt que la PC microbienne (v. § 3.2).

### 3.4.6 Administration par inhalation

#### Repères

- *On devrait administrer une matière d'essai à des oiseaux ou à de petits mammifères par inhalation s'il est possible que la nouvelle substance microbienne vienne en contact avec les vertébrés terrestres du milieu naturel sous forme de brouillard fin ou de pulvérisation.*
- *L'instillation nasale ou trachéale et l'aérosolisation constituent des modes d'exposition possibles par inhalation. L'instillation nasale est à privilégier; en général, l'aérosolisation est le mode d'exposition le moins acceptable du fait qu'il est difficile d'atteindre la dose appropriée. La procédure utilisée pour administrer la matière d'essai à la DDM doit être la même pour les animaux recevant des traitements témoins.*

<sup>28</sup> Dans le cas d'un témoin négatif, il s'agit de l'eau d'essai; pour le témoin chimique positif, il s'agit d'une concentration du *toxique de référence* dissous dans l'eau d'essai. Dans le cas d'un témoin non infectieux, la matière d'essai modifiée administrée par gavage est une suspension aqueuse; pour le témoin sur filtrat stérile, cette matière est un liquide (v. section 4).

- *Des précautions particulières s'imposent lors de l'administration d'une matière d'essai à des oiseaux ou à de petits mammifères par instillation nasale ou trachéale.*
- *Aucun solvant autre qu'une solution saline isotonique ne devrait être utilisé pour diluer la matière d'essai lors de la préparation de la ou des concentrations expérimentales de la nouvelle substance microbienne administrée par inhalation.*

Si une nouvelle substance microbienne risque de pénétrer dans le milieu naturel sous forme de brouillard fin ou de vaporisation de particules colloïdales, les essais de laboratoire sur des oiseaux ou de petits mammifères devraient comporter l'administration de cette substance par inhalation (c.-à-d. dans les voies respiratoires) (v. § 14.1.2 et 14.2.2). L'*instillation nasale* ou *trachéale* et la pulvérisation d'aérosols constituent des modes d'exposition possibles par inhalation. L'instillation nasale est à privilégier. L'instillation trachéale permet de s'assurer que la matière d'essai pénètre directement dans les voies respiratoires inférieures. Ce mode d'administration de la matière d'essai est toutefois relativement invasif et peut exiger le recours à des analgésiques, particulièrement dans le cas des plus gros animaux. Ce sont l'instillation nasale et/ou la pulvérisation d'aérosols qui reproduisent le plus fidèlement les voies habituelles d'exposition dans le milieu naturel.

L'administration d'une matière d'essai à des oiseaux ou à de petits mammifères par aérosolisation est généralement le mode d'exposition le moins indiqué, et ce, pour plusieurs raisons<sup>29</sup>. Selon les propriétés physiques de la matière d'essai et la façon dont celle-ci sera dispersée dans le milieu naturel, cette matière peut, dans certains cas, être administrée par *aérosolisation* dans une enceinte fermée (USEPA, 1996; ARLA, 2001). Lorsque le demandeur choisit ce mode d'exposition (plutôt que l'instillation nasale ou trachéale), il devrait présenter à la DSN

<sup>29</sup> Il est beaucoup plus difficile d'administrer une dose équivalente par le biais d'aérosols que par instillation nasale ou trachéale. En outre, les rongeurs ne respirent pas par la bouche et la géométrie nez-pharynx de ces espèces ne se prête pas à la plupart des modes d'administration sous forme d'aérosols. L'exposition par aérosolisation peut aussi donner lieu au lissage ou au léchage de la fourrure ou des plumes contaminées par la matière d'essai et occasionner le transfert d'une certaine quantité de la matière d'essai à la cavité buccale.

d'Environnement Canada une justification écrite de son choix (lors de la consultation avant la déclaration; v. § 1.1.6) avant de procéder aux essais.

Il est recommandé de diluer la matière d'essai avec une *solution saline isotonique* plutôt qu'avec une eau désionisée pour les raisons suivantes : (i) cette solution favorise la viabilité des micro-organismes dans le cas d'essais sur des agents infectieux; (ii) elle irrite moins les muqueuses de l'animal d'essai (hôte).

La sous-section 3.3.1 et la section 14 décrivent la façon de calculer la quantité de matière d'essai à administrer par inhalation aux animaux de chaque traitement de répétition afin d'atteindre la DDM (ou des doses plus faibles dans le cas d'essais à concentrations multiples). Dans le cas des oiseaux, le volume ne devrait généralement pas dépasser 0,2 mL/kg de masse corporelle (USEPA, 1996). Pour les rongeurs, il ne devrait pas dépasser 3,0 mL/kg (USEPA, 1996p).

Certains produits microbiens sont visqueux ou renferment des quantités proportionnellement élevées de porteurs inorganiques ou organiques. Dans de tels cas, on conseille d'administrer aux oiseaux et aux rongeurs la nouvelle substance microbienne elle-même plutôt que la PC microbienne (v. § 3.2).

Il ne faut pas utiliser de solvant (autre que la solution saline isotonique) pour préparer une concentration expérimentale, car il pourrait être toxique pour la nouvelle substance microbienne et causer une irritation inutile des muqueuses des animaux d'essai. Il convient de consulter et d'appliquer, le cas échéant, les indications de la sous-section 3.4.1 sur la préparation de suspensions aqueuses « difficiles » de la matière d'essai à administrer par inhalation à des oiseaux ou à de petits mammifères.

Les méthodes d'essai recommandées pour l'administration d'une matière d'essai par inhalation prévoient une dose par jour pendant les cinq premiers jours des essais sur des oiseaux (§ 14.1.2) et une seule dose au début des essais sur des rongeurs (§ 14.2.2). Pendant chaque exposition, il faut administrer chaque traitement témoin selon la procédure ayant servi à administrer la ou les doses d'essai par inhalation (v. section 4). En d'autres termes, on doit utiliser la même quantité de solution saline et la même procédure de dosage tant pour les groupes recevant la DDM que pour les groupes témoins négatifs. De

même, il faut administrer à tout *témoin non infectieux* ou *témoin sur filtrat stérile* de répétition (section 4) une vaporisation fine de la matière d'essai (modifiée) en utilisant un système de dosage et une quantité de substance identiques à ceux ayant servi à administrer la DDM. Cette procédure s'applique aussi à tout *témoin chimique positif* ou *témoin microbien positif* faisant partie de l'essai.

Dans tous les cas, il faut veiller à ne pas causer un stress excessif chez les organismes d'essai ou les blesser (§ 7.2). Les techniques de manipulation et les procédures d'instillation nasale ou trachéale devraient être identiques pour tous les animaux.

### 3.5 Quantification de la concentration de micro-organismes

#### Repères

- *Il faut connaître la concentration de micro-organismes viables dans le sous-lot de la matière d'essai. Le déclarant doit fournir cette information au laboratoire d'essai, de même que des renseignements sur la technique d'analyse ayant servi à quantifier cette concentration. Lors de la mise en route des essais de laboratoire, au moins trois aliquotes de la matière d'essai devraient faire l'objet de nouvelles analyses pour déterminer leur teneur en micro-organismes.*
- *Si les techniques d'analyse le permettent, il faudrait surveiller la concentration de la nouvelle substance microbienne (c.-à-d. le nombre de micro-organismes viables) dans la ou les concentrations expérimentales administrées aux organismes d'essai. Les procédures d'échantillonnage et d'analyse servant à quantifier la concentration ou la dose à laquelle les organismes d'essai sont exposés varient en fonction du mode d'administration (p. ex., dans l'eau, le sédiment, le sol ou les aliments, par gavage ou par inhalation) et de la fréquence d'administration (p. ex., renouvellement intermittent pour un mélange dans l'eau; au début de l'essai seulement pour un mélange dans le sédiment ou le sol).*
- *Les procédures de prélèvement et d'analyse d'aliqotes du ou des substrats témoins négatifs devraient être les mêmes que celles utilisées pour analyser la concentration de la nouvelle substance microbienne dans le ou les substrats d'essai (ou, dans le cas de vertébrés terrestres, dans les suspensions aqueuses de la matière d'essai administrée par gavage ou par inhalation).*

*Lorsqu'un essai comporte un témoin non infectieux et/ou un témoin sur filtrat stérile, le responsable de l'essai devrait appliquer aux aliquotes des traitements connexes les mêmes procédures que celles utilisées pour la ou les concentrations expérimentales.*

Il faut connaître et déclarer la concentration de micro-organismes viables dans le *sous-lot* de la matière faisant l'objet d'essais de pathogénicité et/ou de toxicité. Le *déclarant* ou toute autre partie responsable devrait fournir cette information en même temps qu'il remet le sous-lot au laboratoire d'essai. Il devrait aussi fournir des instructions ou des indications sur la procédure d'analyse à suivre pour déterminer les concentrations de la nouvelle substance microbienne dans le ou les *substrats d'essai* auxquels des plantes ou des animaux terrestres ou aquatiques sont exposés au laboratoire. Au moment de mettre en route un essai définitif de pathogénicité et/ou de toxicité, le laboratoire d'essai devrait procéder, idéalement, à de nouvelles analyses de trois aliquotes ou plus du sous-lot qu'il a reçu afin de déterminer la concentration moyenne ( $\pm$  ET) de micro-organismes viables dans la matière d'essai.

Dans son document d'information sur les essais servant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'AAM sur les organismes non visés, l'USEPA (1996b) indique ce qui suit :

*On doit surveiller la teneur de l'eau ou des aliments en AAM afin de s'assurer que les organismes sont exposés à une concentration suffisante d'AAM pendant la durée de l'essai.*

On ne trouve aucune autre indication ou directive sur le sujet dans le document précité, ni dans la plupart des autres rapports de la série 885 de l'OPPTS (USEPA, 1996c-n,p,r-u)<sup>30</sup>. Les *modes opératoires normalisés* qu'utilisent les laboratoires privés menant des essais sur les effets écologiques d'AAM conformément aux lignes directrices de la série 885 (p. ex., USEPA, 1996a-u) font souvent état du

prélèvement d'aliquotes du *substrat d'essai* au début de tels essais et pendant ceux-ci, de même que des analyses de leur teneur en nouvelle substance microbienne. Ni EC et SC (2001) ni ARLA (2001) ne mentionnent d'exigences ou de recommandations relatives à la quantification de la concentration des nouvelles substances microbiennes auxquelles sont exposés des plantes ou des animaux aquatiques ou terrestres pendant les essais de laboratoire sur les effets pathogènes et/ou toxiques de ces substances.

Si les techniques d'analyse le permettent, on devrait mesurer la concentration de la nouvelle substance microbienne dans le ou les substrats d'essai auxquels une matière d'essai est mélangée (v. § 3.4.1 à 3.4.4) au moment de la préparation de ces mélanges, de même qu'au cours et/ou à la fin de l'essai. Les procédures d'analyse servant à déterminer la concentration d'une nouvelle substance microbienne particulière dans le *substrat d'essai* (eau, sédiment, sol ou aliments d'essai) peuvent, selon le micro-organisme en cause (p. ex., une bactérie, un champignon ou un protozoaire facilement quantifiable par numération sur plaque), être relativement simples si l'on utilise une des méthodes normalisées décrites dans APHA et coll. (1998, ou version plus récente). Par contre, si un virus est en cause, par exemple, la quantification à l'aide des techniques d'analyse disponibles peut s'avérer difficile, voire impossible.

La méthode utilisée pour déterminer la concentration de la nouvelle substance microbienne de chaque traitement témoin doit être la même que celle appliquée au ou aux substrats d'essai. En conséquence, pour le *témoin négatif* inclus dans l'essai (§ 4.1), des aliquotes non traitées du ou des substrats d'essai (eau, sédiment, sol et/ou aliments) auxquels la matière d'essai est mélangée doivent être prélevées et analysées pour déterminer la concentration de la nouvelle substance microbienne de la même façon que dans le cas du ou des traitements d'essai. De même, lorsqu'un essai comporte un *témoin non infectieux* (§ 4.4) ou un *témoin sur filtrat stérile* (§ 4.5), il faut échantillonner et analyser celui-ci selon les mêmes procédures que celles utilisées pour le ou les traitements d'essai. Le nombre d'aliquotes de répétition d'un traitement témoin que l'on prélève pour quantifier leur teneur en nouvelle substance microbienne au début et au cours de l'essai doit être identique au nombre d'aliquotes de la ou des concentrations expérimentales. Il n'est pas

<sup>30</sup> Dans ses lignes directrices concernant les essais de pathogénicité/toxicité d'AAM pour des rongeurs exposés par voie orale (gavage) ou par inhalation, l'USEPA (1996o,q) indique qu'il faudrait déterminer, si possible, le nombre d'unités infectieuses viables ou potentiellement viables dans chaque dose, et ce, en même temps que l'on procède aux essais.

nécessaire de mesurer la concentration de la nouvelle substance microbienne dans le *témoin chimique positif* (§ 4.2), mais le responsable de l'essai peut choisir de procéder à cette mesure afin de s'assurer que les valeurs établies pour ces traitements ne sont pas faussées par une contamination non intentionnelle attribuable à la nouvelle substance microbienne. Si les techniques d'analyse le permettent, il est recommandé de mesurer la concentration d'un micro-organisme donné dans tout *témoin microbien positif* (§ 4.3) inclus dans l'essai.

Certaines méthodes d'essai biologique faisant appel à des organismes aquatiques prévoient le renouvellement de l'*eau d'essai* à laquelle est mélangée une nouvelle substance microbienne (§ 3.4.1) à intervalles fréquents et définis pendant la durée de l'essai (v. sections 9 à 11). Si les techniques d'analyse le permettent, la concentration de la nouvelle substance microbienne dans ce substrat d'essai devrait être mesurée à 0 h (c.-à-d. au début de l'essai), au terme de l'essai et au moins une fois par semaine au début et à la fin du cycle (USEPA, 1996bb)<sup>31</sup>. Cette concentration peut aussi être mesurée dans la ou les suspensions d'essai fraîches et âgées au début et à la fin de chaque période de renouvellement intermittent. La concentration moyenne ( $\pm$  ET) mesurée pour toutes les analyses de chacun des traitements devrait être calculée, puis comparée à la concentration nominale. Il est également recommandé de calculer et de comparer la concentration moyenne de la nouvelle substance microbienne dans les suspensions fraîches et les suspensions âgées de l'*eau d'essai* à laquelle les organismes sont exposés afin de déterminer la variation de la concentration pendant l'essai à renouvellement intermittent. En outre, il serait utile de porter sur un graphique les valeurs mesurées de chaque concentration expérimentale fraîche pendant

<sup>31</sup> Des aliquotes de suspensions fraîches peuvent être prélevées du mélange à répartir entre chacune des enceintes expérimentales (v. § 3.4.1). On devrait prélever des aliquotes des suspensions âgées au centre de l'*eau d'essai* des enceintes. Il pourrait être nécessaire ou utile de regrouper les aliquotes des enceintes expérimentales de répétition lors de chaque échantillonnage des suspensions âgées afin d'obtenir un volume suffisant pour les analyses ou en tant que moyen économique de déterminer la concentration moyenne. Si l'échantillonnage a lieu une fois par semaine au début et à la fin du cycle de renouvellement et si les cycles de renouvellement varient (p. ex., tous les deux ou trois jours), on devrait prélever les aliquotes fraîches et âgées pendant le plus long cycle de la séquence hebdomadaire (USEPA, 1996bb).

la durée de l'exposition dans le but de vérifier la stabilité du *sous-lot* de la matière d'essai utilisée pour préparer chaque concentration expérimentale.

Pour les essais dans lesquels la matière d'essai est mélangée à un sédiment ou à un sol (v. § 3.4.2 et 3.4.3), il faudrait prélever au moins trois aliquotes de chaque mélange frais (y compris celui du ou des traitements témoins) dans le *lot* fraîchement préparé en vue d'en déterminer la teneur en nouvelle substance microbienne. Au terme de l'essai, trois aliquotes ou plus du sédiment ou du sol des enceintes expérimentales devraient aussi être prélevées dans les répétitions de chaque traitement<sup>32</sup>. Une fois établie, la moyenne ( $\pm$  ET) des six analyses de chaque traitement constitue une mesure de la concentration moyenne dans le sédiment ou le sol pendant l'essai. Il est recommandé de comparer la concentration moyenne dans le substrat d'essai frais et celle à la fin de l'essai pour déterminer à quel point la concentration a varié.

Pour les essais dans lesquels la matière d'essai administrée aux organismes est mélangée aux aliments (v. § 3.4.4), la concentration de la nouvelle substance microbienne dans chaque ration offerte devrait être quantifiée si les techniques d'analyse le permettent. À cette fin, on devrait prélever au moins une aliquote dans chaque lot d'aliments fraîchement préparé et administré à la ou aux concentrations expérimentales de répétition et les analyser chaque fois que le mélange renfermant la substance est donné aux organismes. Une fois établie, la moyenne ( $\pm$  ET) de toutes les analyses de chaque traitement constitue une mesure de la concentration moyenne dans les aliments pendant l'exposition.

On devrait mesurer la concentration de la nouvelle substance microbienne dans chaque suspension de la matière d'essai administrée par voie orale (gavage) (§ 3.4.5) ou par inhalation (§ 3.4.6) à des oiseaux ou à de petits mammifères, si possible en parallèle avec chaque traitement administré pendant l'essai. On prélèvera à cette fin au moins une aliquote dans chaque suspension aqueuse de la matière d'essai

<sup>32</sup> Si l'on souhaite obtenir davantage de renseignements sur l'évolution de la teneur en nouvelle substance microbienne du sédiment ou du sol, il faudrait prévoir, dès la mise en route de l'essai, des jeux supplémentaires d'enceintes expérimentales pour chaque traitement et procéder à des échantillonnages destructifs selon la fréquence de surveillance souhaitée.

chaque fois que la ou les doses expérimentales sont administrées. Une fois établie, la moyenne ( $\pm$  ET) de toutes les analyses de chaque traitement constitue, dans le cas d'essais sur des oiseaux, une mesure de la concentration microbienne moyenne dans chaque dose administrée<sup>33</sup>.

Si la matière d'essai à laquelle les oiseaux et les rongeurs sont exposés est un liquide (p. ex., une suspension aqueuse), on analysera une aliquote diluée ou non diluée de la matière d'essai (v. § 3.4.5 et 3.4.6). S'il s'agit d'un solide (p. ex., une poudre), il faudra procéder à des analyses préliminaires des concentrations de la nouvelle substance microbienne dans des suspensions aqueuses de quantités variables

de la matière d'essai dans l'eau, et ce, après avoir mélangé soigneusement chaque suspension. Il faut procéder à ces analyses préliminaires pour déterminer la quantité appropriée de matière d'essai (solide) à mélanger à l'eau d'essai pour atteindre la concentration (ou unités microbiennes par millilitre) correspondant à la DDM (v. § 3.3.1) et, dans le cas d'un essai à concentrations multiples (v. § 3.3.2), pour obtenir des concentrations plus faibles. La DDM doit représenter la concentration la plus élevée d'unités microbiennes dans l'eau qui puisse être préparée sous forme de suspension aqueuse de la matière d'essai (solide) et qui convienne à une administration par inhalation ou par voie orale (gavage) aux organismes d'essai (hôtes).

---

<sup>33</sup> Cette procédure ne s'applique qu'aux méthodes d'essai recommandées pour les oiseaux, qui comportent l'administration d'une dose par jour pendant les cinq premiers jours de l'essai (v. § 14.1.2). Elle fournit une indication de la *précision* de la dose administrée au fil du temps, de même que de la stabilité de la matière d'essai pendant la période d'exposition. Quant aux méthodes d'essai recommandées pour les rongeurs (v. § 14.2.2), ces derniers ne reçoivent qu'une dose de la matière d'essai au début de l'essai.

## Traitements témoins

### 4.1 Témoin négatif

#### Repères

- *Pour être probant et jugé valide, chaque essai doit comporter un traitement témoin négatif.*
- *Les conditions et procédures appliquées au traitement témoin négatif doivent être identiques à celles utilisées pour la ou les concentrations expérimentales, sauf que ce traitement ne renferme aucune matière d'essai (modifiée ou non).*

Un *témoin négatif* est un traitement qui ne renferme aucune substance susceptible d'avoir un effet défavorable sur la survie, le comportement, la reproduction, la croissance ou tout autre paramètre biologique mesuré au moyen d'une méthode d'essai biologique donnée. Tout essai doit comporter un tel traitement, lequel sert à vérifier l'absence de pathogénicité et/ou de toxicité attribuables aux conditions de base de l'essai, par exemple, la température, la santé des organismes d'essai ou les effets de la manipulation de ces derniers. Pour que les résultats d'un essai soient considérés comme probants et valides, le témoin négatif doit satisfaire aux critères de validité propres à l'essai.

Les groupes de répétition faisant partie du témoin négatif sont traités de la même façon que les groupes exposés à une ou des concentrations expérimentales, sauf qu'ils ne sont pas exposés à la matière d'essai (modifiée ou non). Dans un essai où la nouvelle substance microbienne est mélangée à l'eau d'essai (v. § 3.2 et 3.4.1), les groupes témoins négatifs sont exposés à l'eau d'essai seulement. Cette dernière est mélangée de la même façon que la ou les concentrations expérimentales. Dans un essai où la nouvelle substance microbienne est mélangée à un sédiment ou un sol d'essai *non contaminé*, les groupes témoins négatifs sont exposés au seul substrat d'essai qui a été mélangé selon la procédure utilisée pour la ou les concentrations expérimentales (v. § 3.2, 3.4.2 et 3.4.3). Quant aux essais où la nouvelle substance microbienne est mélangée aux aliments, les groupes témoins négatifs reçoivent une ration d'aliments qui a été mélangée selon la procédure utilisée pour les aliments renfermant la matière d'essai, mais qui est exempte de cette matière

(modifiée ou non) (v. § 3.2 et 3.4.4). Les groupes témoins négatifs inclus dans un essai sur des oiseaux ou de petits mammifères auxquels on administre la matière d'essai par voie orale (gavage) ou par inhalation reçoivent la même quantité d'eau d'essai seule que les organismes recevant une suspension aqueuse de la nouvelle substance microbienne mélangée à l'eau d'essai (v. § 3.2, 3.4.5 et 3.4.6).

Tout traitement témoin négatif et tout traitement d'essai doivent comporter des nombres identiques de répétitions et d'organismes d'essai par répétition. Toutes les autres conditions et procédures qui s'appliquent aux groupes témoins négatifs et aux groupes exposés à la ou aux concentrations expérimentales de la nouvelle substance microbienne doivent également être identiques. Les organismes d'essai placés dans chacune des enceintes expérimentales, y compris ceux constituant le groupe témoin négatif (et tout autre groupe témoin; v. § 4.2 à 4.5 incl.), doivent provenir de la même population et de la même source et être assignés au hasard à chaque enceinte.

### 4.2 Témoin chimique positif

#### Repères

- *Certaines des méthodes d'essai biologique recommandées exigent le recours à un témoin chimique positif lors d'un essai définitif.*
- *Un témoin chimique positif permet au laboratoire d'exercer à l'interne, à l'aide d'un toxique de référence, un contrôle de la qualité quant à l'état des organismes d'essai et à la précision et à la fiabilité des résultats des essais.*

Un *témoin chimique positif* consiste en un essai faisant appel à des concentrations multiples d'un produit chimique toxique; il est mené vers le même moment qu'un essai définitif sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne. Le *toxique de référence* utilisé dans cet essai est connu pour ses effets défavorables sur la survie, le comportement, la reproduction, la croissance ou tout autre paramètre biologique mesuré au moyen d'une méthode d'essai biologique donnée, et ce, d'une manière prévisible et démontrable. Les laboratoires

d'essai utilisent couramment cet étalon chimique pour mesurer la sensibilité des organismes d'essai et établir la fiabilité des données sur la toxicité d'une substance d'essai. Dans la plupart des cas, on procède à un essai de toxicité au moyen d'un toxique de référence afin d'évaluer la sensibilité des organismes au moment où l'on évalue la substance d'essai ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus à l'égard de cette substance.

Un bon nombre des méthodes d'essai biologique recommandées aux sections 9 à 13 inclusivement exigent ou préconisent l'utilisation systématique d'un témoin chimique positif comme moyen de contrôle interne de la qualité. Selon la méthode retenue, l'essai avec témoin chimique positif peut avoir lieu lors de l'essai définitif ou à un autre moment (p. ex., dans les 30 jours), pourvu que les organismes d'essai proviennent du même groupe (p. ex., un récipient de culture, ou encore un récipient ou plus de rétention d'organismes issus d'une même population) que ceux de l'essai définitif. Selon ce qui est spécifié dans la méthode d'essai biologique, les procédures et conditions applicables à l'essai avec témoin chimique positif (toxique de référence) peuvent être identiques à celles de l'essai définitif ou être simplifiées (p. ex., durée moins longue, comme dans EC 2004b; simplification de l'exposition à la substance d'essai, comme dans EC 1992e, 1997 a,b, 1998a, 2001a).

Les résultats de l'essai sont reportés sur une *carte de contrôle* et comparés aux données historiques recueillies par le laboratoire lors d'essais menés avec le même produit chimique et selon la même procédure. Toute valeur qui se situe à l'extérieur des *limites de la zone de confiance* ( $\pm 2$  ET des valeurs obtenues lors d'essais antérieurs) indique au laboratoire que la sensibilité des organismes d'essai et/ou le rendement et la précision de l'essai sont suspects. De tels résultats déclenchent la vérification de toutes les conditions de culture ou de rétention auxquelles les organismes d'essai sont soumis, de même que des conditions et procédures connexes à l'*essai toxicologique de référence* dont les résultats sont mis en question. Selon le cas, il pourrait être nécessaire de répéter l'essai toxicologique de référence et/ou d'obtenir un nouvel approvisionnement (ou, dépendamment de l'essai, une nouvelle culture) d'organismes d'essai avant d'entreprendre les essais définitifs à l'aide de cette méthode. Lorsque les résultats d'un essai avec témoin chimique positif se situent hors des limites de la zone

de confiance, ils n'invalident pas nécessairement les résultats de l'essai définitif portant sur une nouvelle substance microbienne, mais ils peuvent soulever des questions ou des préoccupations à leur égard.

Certaines méthodes d'essai biologique recommandées dans le présent guide (soit les essais sur des vertébrés terrestres; section 14) n'exigent pas la conduite d'un essai toxicologique de référence parallèlement à un essai définitif avec une nouvelle substance microbienne ou une autre matière d'essai. C'est pourquoi il n'est pas nécessaire d'intégrer un témoin chimique positif dans ces méthodes (ou en parallèle à celles-ci), car il pourrait ne servir aucune fin utile. Cependant, une telle intégration pourrait être indiquée si le laboratoire d'essai a compilé des données historiques et établi des cartes de contrôle sur le rendement du produit chimique en question et des méthodes d'essai, en particulier s'il s'agit de données sur un toxique de référence utilisé dans les méthodes d'essai biologique comportant une nouvelle substance microbienne.

#### 4.3 *Témoin microbien positif*

##### **Repères**

- *L'inclusion d'un témoin microbien positif dans un essai portant sur une nouvelle substance microbienne n'est pas exigée et, pour la plupart des applications, n'est pas recommandée pour le moment en raison des coûts connexes et de l'absence d'un pathogène ayant une parenté génétique avec le micro-organisme et des effets connus sur l'organisme d'essai (hôte).*
- *Un témoin microbien positif pourrait être utile dans certains cas, car il pourrait donner l'assurance que les organismes d'essai réagissent à un pathogène microbien de référence (étalon) et que la méthode d'essai biologique convient. Compte tenu de ce fait, l'identification et l'utilisation futures de pathogènes pouvant servir de témoins microbiens positifs dans des méthodes d'essai biologique données pourraient être justifiées.*

Un *témoin microbien positif* est un traitement qui renferme un *pathogène* infectieux connu pour ses effets défavorables sur la survie, le comportement, la reproduction, la croissance ou tout autre paramètre biologique mesuré au moyen d'une méthode d'essai biologique donnée, et ce, d'une manière prévisible et démontrable. Un témoin microbien positif utilisé dans un essai portant sur une nouvelle substance



microbienne consiste en une seule concentration d'un micro-organisme autre que celui que l'on trouve dans la matière d'essai à l'étude et dont on sait qu'il aura des effets défavorables et prévisibles pendant le déroulement de la méthode d'essai utilisée. En général, le micro-organisme (et sa concentration) servant de témoin microbien positif devrait avoir été utilisé de façon itérative par le laboratoire au cours d'essais effectués selon la même méthode d'essai biologique que celle employée pour la nouvelle substance microbienne à l'étude.

L'intégration d'un *témoin microbien positif* dans un essai définitif portant sur une nouvelle substance microbienne permet de vérifier que les conditions et procédures d'essai sont telles que la pénétration et l'infection microbiennes ainsi que le développement d'une maladie se produiront sans doute chez un hôte vulnérable (c.-à-d. l'organisme d'essai), et ce, d'une manière prévisible et fiable. Au moment d'envisager l'utilisation d'un témoin microbien positif, on devrait porter attention à la nature de la nouvelle substance microbienne à l'étude et tenter d'employer un pathogène connu présentant des similarités avec cette substance.

Les méthodes d'essai biologique de la série 885 de l'USEPA (1996a-u) exigent ou recommandent rarement d'inclure un témoin microbien positif dans un essai définitif visant à mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité d'un AAM ou d'une PC connexe<sup>34</sup>. C'est pourquoi les laboratoires privés effectuant des essais selon ces lignes directrices (série 885) n'utilisent généralement pas de témoin microbien positif dans le cadre de leurs modes opératoires normalisés, ni n'en font mention.

L'inclusion d'un *témoin microbien positif* dans un essai visant à mesurer l'effet ou les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne, conformément à l'une ou l'autre des méthodes d'essai

<sup>34</sup> Font exception les lignes directrices de l'USEPA applicables aux plantes non visées (USEPA, 1996c), qui exigent l'inclusion d'un témoin microbien positif dans les essais portant sur un herbicide microbien ou un AAM semblable à un pathogène connu des plantes. Ces lignes directrices précisent que, pour de tels essais, « la plante nuisible visée et l'herbicide microbien devraient constituer le témoin positif »; une telle application (c.-à-d. l'utilisation de la plante nuisible visée comme témoin microbien positif) peut aller à l'encontre de celle décrite ici, car l'organisme utilisé comme témoin microbien positif pourrait être différent de celui exposé à la nouvelle substance microbienne à l'étude.

biologique recommandées dans le présent guide (v. sections 9 à 14), n'est pas exigée et, pour la plupart des applications, n'est pas recommandée en raison des coûts connexes et de l'absence d'un pathogène ayant une parenté génétique avec cette substance et des effets connus sur l'organisme d'essai (hôte). Des *témoins microbiens positifs* appropriés n'ont toujours pas été identifiés pour la plupart des méthodes d'essai biologique recommandées ici. Toutefois, il pourrait être indiqué d'inclure un témoin microbien positif dans un essai avec une nouvelle substance microbienne si l'on dispose d'un pathogène convenable (c.-à-d. présentant une parenté génétique avec l'organisme d'essai et dont on sait qu'il a des effets pathogènes et/ou toxiques lorsqu'on utilise une méthode donnée).

#### 4.4 Témoin non infectieux

##### Repères

- *Il est vivement recommandé d'inclure un témoin non infectieux dans tous les essais visant à mesurer l'infectivité d'une nouvelle substance microbienne.*
- *L'intégration d'un témoin non infectieux dans le plan d'expérience peut s'avérer très utile, car ce témoin permet de déterminer si les effets nocifs de l'exposition d'organismes d'essai à une nouvelle substance microbienne sont attribuables à la pathogénicité de la substance plutôt qu'à sa toxicité.*
- *La décision d'inclure ou non un témoin non infectieux dans l'une ou l'autre ou dans l'ensemble des méthodes d'essai biologique utilisées pour évaluer une nouvelle substance microbienne dépend des objectifs du programme d'essais.*

Un *témoin non infectieux* est un traitement témoin dans lequel la matière d'essai à sa CDM<sup>35</sup> a été traitée auparavant (p. ex., par voie thermique) en vue d'inactiver les micro-organismes viables qu'elle renferme, tout en préservant leur intégrité structurale (p. ex., les parois cellulaires s'il s'agit d'une bactérie). Ce témoin permet de déterminer si la CDM atténuée (non infectieuse) peut avoir un ou des effets nocifs sur les organismes d'essai une fois supprimée sa

<sup>35</sup> On utilise la CDM pour préparer ce traitement, étant donné qu'elle représente la concentration de la matière d'essai à laquelle les organismes sont exposés dans un essai à concentration unique (v. § 3.3.1), de même que la concentration la plus élevée dans un essai à concentrations multiples (v. § 3.3.2).

capacité de causer une infection et, par la suite, d'avoir des effets pathogènes. Il sert aussi à mesurer à quel point les micro-organismes complets mais non viables présents dans la matière d'essai, de même que les métabolites et/ou les porteurs solubles ou particuliers qu'elle renferme, exercent des effets nocifs sur les organismes d'essai. En éliminant le potentiel d'infectivité de la matière d'essai tout en préservant ses autres caractéristiques, on peut déterminer, grâce au témoin non infectieux, si les effets nocifs d'une nouvelle substance microbienne sont attribuables à sa pathogénicité (plutôt qu'à sa toxicité).

Les méthodes d'essai biologique de la série 885 de l'USEPA (1996a-u) servant à mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité d'un AAM ou d'une PC connexe recommandent, dans certaines des lignes directrices applicables aux essais portant sur des pesticides, d'inclure un témoin non infectieux. Le guide qui renferme une vue d'ensemble de la série (USEPA, 1996a) mentionne que l'inclusion d'un témoin non infectieux dans un essai permet de recueillir des informations utiles quant au mécanisme de pathogénèse. Pour les essais sur des *insectes* non visés, l'USEPA (1996i) recommande d'inclure un témoin non infectieux ou un « témoin exempt de microbes » (ce qui signifie sans doute un témoin sur filtrat stérile; v. § 4.5). Cette même recommandation vaut pour les essais sur des abeilles domestiques (USEPA, 1996j). Pour les essais sur des oiseaux, l'agence recommande (USEPA, 1996k) ou exige (USEPA 1996l,m) l'inclusion, comme témoin, d'une matière d'essai qui a été inactivée tout en préservant l'intégrité structurale (p. ex., les parois cellulaires s'il s'agit d'une bactérie) du micro-organisme (c.-à-d. un témoin non infectieux). Quant aux essais sur des rongeurs, l'USEPA indique que le recours à un témoin non infectieux « peut être utile pour évaluer les propriétés toxiques de l'AAM » (USEPA, 1996o,q,t) ou « est recommandé » (USEPA, 1996u). Il est souvent exigé ou recommandé, dans les modes opératoires normalisés qu'utilisent les laboratoires privés effectuant des essais selon ces lignes directrices (série 885), d'inclure un témoin non infectieux (et/ou un témoin sur filtrat stérile; v. § 4.5) dans les essais sur les invertébrés aquatiques, les poissons et les invertébrés terrestres. L'ARLA (2001) indique qu'un témoin non infectieux doit être inclus dans les essais mettant en cause des AAM et des oiseaux ou des mammifères.

Aucune des méthodes d'essai biologique recommandées en lien avec le présent guide n'exige l'inclusion d'un témoin non infectieux dans les essais. Néanmoins, il est vivement recommandé d'inclure un tel témoin dans chacun des plans d'expérience, et ce, pour tous les essais visant à mesurer (et à distinguer) l'infectivité et la pathogénicité résultante d'une nouvelle substance microbienne. Si l'essai a pour seul objectif de satisfaire aux exigences en matière de renseignements concernant les effets écologiques possibles d'une nouvelle substance microbienne (Gouvernement du Canada, 1997; EC et SC, 2001), il n'est pas nécessaire de déterminer si les effets nocifs observés sont attribuables à la pathogénicité de la nouvelle substance microbienne ou à sa toxicité. Les déclarants qui veulent savoir si des effets donnés sont attribuables à la toxicité d'une substance plutôt qu'à sa pathogénicité (ou à celle-ci également) devraient cependant envisager d'inclure un témoin non infectieux dans le plan d'expérience<sup>36</sup>.

Il est possible d'inclure un témoin non infectieux dans chacune des méthodes d'essai biologique recommandées aux sections 9 à 14. Si le déclarant décide de procéder ainsi, il devrait fournir au *directeur de l'étude* ou au *responsable principal des essais* (v. § 6.1) la quantité nécessaire de matière d'essai atténuée (non infectieuse) ou des indications détaillées quant à la façon de la préparer (p. ex., température, durée et équipement de stérilisation, le cas échéant).

<sup>36</sup> Si les résultats obtenus avec la matière d'essai et le témoin non infectieux révèlent une réaction positive, on peut conclure que la matière d'essai est toxique et peut-être pathogène. Par contre, si les résultats révèlent une réaction positive dans le cas de la matière d'essai seulement, on peut conclure que cette matière est pathogène mais non toxique. Lorsqu'un essai comportant un produit microbien et un témoin non infectieux montre que la CDM atténuée (non infectieuse) est toxique pour les organismes d'essai, on pourrait envisager une reformulation du produit microbien en vue d'éliminer ou de réduire la ou les causes de la toxicité observée.

#### 4.5 Témoin sur filtrat stérile

##### Repères

- *L'inclusion d'un témoin sur filtrat stérile dans un essai portant sur une nouvelle substance microbienne est facultative.*
- *Un témoin sur filtrat stérile peut s'avérer utile, car il permet de déterminer si les effets nocifs résultant d'une exposition d'organismes d'essai à une nouvelle substance microbienne sont attribuables à la toxicité associée au filtrat stérile d'une suspension aqueuse de la substance plutôt qu'à la pathogénicité de cette substance.*
- *La décision d'inclure ou non un témoin sur filtrat stérile dans l'une ou l'autre ou dans l'ensemble des méthodes d'essai biologique utilisées pour évaluer une nouvelle substance microbienne dépend des objectifs du programme d'essais.*

Un *témoin sur filtrat stérile* est un traitement à la CDM de la matière d'essai que l'on a préalablement stérilisé (pour supprimer les micro-organismes viables) et filtrée (pour enlever les particules en suspension, dont celles associées aux micro-organismes supprimés, et tout solide en suspension connexe à tout porteur présent dans le produit microbien). Ce témoin permet de déterminer si le filtrat stérilisé de la CDM peut avoir un ou des effets nocifs sur les organismes d'essai.

Il sert aussi à vérifier si les métabolites solubles ou les produits chimiques dissous dans le filtrat sont toxiques pour les organismes d'essai. Un essai qui inclut tant un témoin sur filtrat stérile qu'un témoin non infectieux peut permettre, selon les résultats obtenus, de faire la distinction entre les effets toxiques attribuables aux particules en suspension (c.-à-d. des micro-organismes atténués et un ou plusieurs porteurs) et ceux attribuables aux composants solubles associés à un produit microbien<sup>37</sup>. Si l'essai inclut un témoin sur filtrat stérile mais aucun témoin non infectieux, il sera

<sup>37</sup> Si les résultats obtenus avec le témoin non infectieux révèlent des effets toxiques, mais que ce n'est pas le cas avec le témoin sur filtrat stérile, on peut conclure que les effets nocifs observés dans le cas du témoin non infectieux sont associés aux solides en suspension. Par contre, si l'on observe des effets toxiques dans les deux cas, on ne peut que conclure que les composants solubles de la matière d'essai sont toxiques pour les organismes d'essai et que ses solides en suspension peuvent l'être également, mais pas nécessairement.

impossible de déterminer si les solides en suspension dans la ou les concentrations expérimentales ont des effets toxiques sur les organismes d'essai. Dans le cas inverse, il sera impossible de déterminer si les composants solubles (dissous) ont des effets toxiques.

Certaines des lignes directrices de la série 885 (USEPA, 1996a-u) recommandent d'inclure un témoin sur filtrat stérile dans les essais visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de pesticides sur des organismes hôtes. C'est le cas, par exemple, de celles applicables aux essais sur des invertébrés dulcicoles, estuariens ou marins et sur des poissons (USEPA, 1996d,e,i). Pour les essais sur des insectes non visés, y compris les abeilles domestiques, l'USEPA (1996i,j) indique que les témoins inclus dans l'essai devraient provenir d'une « matière exempte de microbes » (ce qui signifie sans doute un témoin sur filtrat stérile) ou ne renfermer que des micro-organismes non viables (c.-à-d. un témoin non infectieux). Dans le cas des essais au niveau I sur des oiseaux exposés à des pesticides par voie orale, il faudrait prévoir un témoin sur filtrat stérile et un témoin non infectieux (USEPA, 1996k). Quant aux autres types d'essai sur des oiseaux (USEPA, 1996l,m) ou des rongeurs (USEPA, 1996o,q,t,u), on ne mentionne pas le recours à un témoin sur filtrat stérile (même si l'inclusion de ce témoin est recommandée; v. § 4.4). Les modes opératoires normalisés qu'utilisent les laboratoires privés effectuant des essais avec des pesticides conformément aux lignes directrices de la série 885 précisent souvent qu'un témoin sur filtrat stérile et/ou un témoin non infectieux doivent être inclus dans certains essais.

Tout comme dans le cas des témoins non infectieux, aucune des méthodes d'essai biologique recommandées en lien avec le présent guide n'exige l'inclusion d'un *témoin sur filtrat stérile* dans les essais. Il est possible de se conformer aux exigences en matière de renseignements concernant les effets écologiques possibles d'une nouvelle substance microbienne (EC et SC, 2001) sans pour autant avoir à déterminer si les effets observés sur des organismes hôtes (plantes ou animaux aquatiques ou terrestres) sont attribuables à la pathogénicité de cette substance ou à sa toxicité. Toutefois, lorsqu'un déclarant souhaite déterminer si les effets nocifs d'une nouvelle substance microbienne particulière sont dus à l'infectivité (et à la pathogénicité résultante) et/ou à la toxicité de celle-ci, il devrait envisager d'inclure dans

le plan de l'étude un témoin sur filtrat stérile et un témoin d'infectivité<sup>38</sup>.

Il est possible d'inclure un témoin sur filtrat stérile dans chacune des méthodes d'essai biologique recommandées aux sections 9 à 14. Si le déclarant décide de procéder ainsi, il devrait fournir

au *directeur de l'étude* ou au *responsable principal des essais* (v. § 6.1) la quantité nécessaire de filtrat stérile de la matière d'essai ou des indications détaillées quant à la façon de le préparer (p. ex., température, durée et équipement de stérilisation, conditions applicables à l'élimination par filtration des matières en suspension).

---

<sup>38</sup> Lorsqu'un essai inclut un témoin non infectieux mais aucun témoin sur filtrat stérile, on peut déterminer si une nouvelle substance microbienne est toxique plutôt que pathogène, mais on ne peut vérifier si les effets toxiques observés sont attribuables aux solides en suspension et/ou dissous de la ou des concentrations expérimentales. Selon le type de micro-organismes que renferme la nouvelle substance microbienne (p. ex., un virus), il pourrait être difficile ou trop coûteux de préparer un témoin non infectieux, ce qui ne serait pas le cas d'un témoin sur filtrat stérile. Le fait d'inclure ces deux types de témoins dans un essai a pour autre avantage de jeter la lumière sur la ou les causes des effets nocifs observés lors d'essais portant sur une nouvelle substance microbienne.

## Essais d'infectivité

### Repères

- *La mesure de l'infectivité sert à déterminer la capacité d'un micro-organisme de traverser ou de contourner les barrières naturelles des organismes d'essai (hôtes) contre l'infection.*
- *À l'exception des essais sur des vertébrés terrestres, la mesure de l'infectivité pendant le déroulement d'une méthode d'essai biologique ou à son terme est facultative. De nombreux facteurs doivent être pris en compte dans la décision d'inclure une telle mesure dans les essais, notamment l'existence d'une méthode d'analyse appropriée, la quantité d'homogénat de tissus, d'organes ou de corps entiers dont on dispose pour les analyses, de même que des questions de coûts-avantages. Dans le cas des essais sur des oiseaux ou des rongeurs, l'infectivité doit être mesurée à la fin des essais si les méthodes d'analyse le permettent.*
- *La mesure de l'infectivité sert à déterminer si l'effet ou les effets nocifs observés pendant un essai sont attribuables à la pathogénicité et/ou à la toxicité de la substance en cause et à satisfaire aux exigences du Règlement sur les RSN relatives à l'infectivité des micro-organismes d'essai.*

L'*infectivité* a été définie comme étant « la capacité d'un micro-organisme de traverser ou de contourner les barrières naturelles de l'hôte contre l'infection » (USEPA, 1996a), « la capacité d'un micro-organisme de s'établir au sein d'une espèce hôte » (EC et SC, 2001) ou « la capacité d'un AAM [un micro-organisme] d'envahir un organisme, de s'y maintenir à l'état viable ou d'y proliférer, avec ou sans manifestation pathologique » (ARLA, 2001). Chacune de ces définitions aide à cerner le sens donné à ce terme dans le présent guide (voir la section « Terminologie », qui débute à la p. xvi). Lors de la mesure de l'infectivité, on établit l'abondance de micro-organismes envahissants dans des homogénats de tissus, d'organes ou de corps entiers d'organismes d'essai (hôtes). L'infection de tissus ou d'organes peut se traduire par une maladie assortie de signes cliniques, par une infection latente qui pourrait se déclarer ultérieurement ou par l'installation d'un état où des individus sains deviennent des porteurs du micro-organisme et le répandent autour d'eux.

Une fois introduit dans un organisme d'essai (hôte) par un ou plusieurs modes d'exposition (v. § 3.2), un micro-organisme peut infecter celui-ci et influencer sur l'induction et la régulation de ses réactions immunitaires primaires et secondaires, de même que sur son immunité à court ou à long terme (c.-à-d. ses divers mécanismes de défense). Le système immunitaire des animaux est généralement diffus et complexe; pratiquement tous les tissus et organes sont reliés entre eux et peuvent être touchés d'une manière ou d'une autre lors d'une exposition microbienne. L'étendue des effets nocifs d'une infection est inversement liée à la vitesse et à l'efficacité de divers processus de *clairance* (tant immunologiques que biomécaniques). Des chercheurs tentent maintenant de modéliser des aspects dynamiques, comme la formation du complexe immunitaire et la clairance, qui mettent en cause au moins 19 mécanismes immunologiques connus reliés aux processus pathologiques d'un micro-organisme et à la production d'antigènes à médiation immunitaire. Chez les micro-organismes vivants, les mécanismes d'évitement de la clairance immunitaire sont complexes et se recouvrent partiellement.

Toute valeur établie pour les animaux hôtes au cours ou à la fin des essais de pathogénicité et/ou de toxicité est fonction des processus et des taux de clairance en cours. Pendant la clairance, un processus complexe (dans l'espace et le temps) où interviennent au départ des macrophages (et, chez les vertébrés, d'autres cellules dont les monocytes, les neutrophiles, les cellules B et les cellules T) donne lieu à l'adhérence de ceux-ci à des micro-organismes infectieux, puis à l'ingestion et à la suppression/dégradation de ceux-ci, à la sélection d'antigènes et, enfin, à l'inactivation et à l'élimination (translocation) des substances « étrangères » en même temps que des parties de cellules hôtes nécrotiques. Ce mécanisme très primitif est commun aux invertébrés et aux vertébrés. Lorsqu'il y a reconnaissance de substances microbiennes « étrangères » chez l'organisme hôte, et dépendamment des antécédents pré-exposition de celui-ci, ces substances sont souvent enrobées d'anticorps et/ou de composants du complément qui facilitent leur adhérence et leur assimilation par les macrophages (de même que leur inactivation par les

neutrophiles). Selon l'ampleur de l'infection, la clairance de micro-organismes envahissants s'accompagne habituellement de lésions du ou des tissus hôtes, lesquelles entraînent la nécrose, l'inflammation et la fibrose, notamment. Certains produits chimiques (p. ex., des contaminants de l'environnement) auxquels un organisme hôte peut avoir été exposé antérieurement ou simultanément altèrent le processus de clairance.

Les symptômes de pathogénicité (p. ex., des histopathologies particulières ou la formation de tumeurs) ne constituent pas des indicateurs fiables et acceptables d'une infection. En effet, il y a parfois absence de signes de pathogénicité, sans compter que des substances microbiennes toxiques — ou les substances d'essai organiques ou inorganiques inanimées qui leur sont associées et qui entrent dans la préparation d'un produit microbien — peuvent provoquer certains changements qui sont visibles pendant une autopsie ou un examen histologique et qui sont identiques à ceux attribuables à une infection. Dans certains cas, des micro-organismes infectieux viables ne sont pas responsables, en eux-mêmes, des signes de pathogénicité observés, ceux-ci étant plutôt causés par des toxines (c.-à-d. la *toxinogénicité*). En outre, pour certains micro-organismes envahissants, particulièrement les champignons, il faut parfois des semaines ou des mois avant que l'on ne détecte une infection (USEPA, 1996cc). L'observation d'une infection sans signes de pathogénicité peut simplement signifier qu'il faut plus de temps avant que les symptômes de la maladie ne se manifestent.

L'étude documentaire de Douville (2001) sur les procédures d'essai ayant trait à l'évaluation de la pathogénicité et de la toxicité de micro-organismes pour la faune aquatique et terrestre exposée en laboratoire ne fait pas état des essais d'infectivité. Le rapport de EC et SC (2001) aborde brièvement le sujet en mentionnant que les méthodes d'essai biologique utilisées devraient permettre de détecter des signes d'infection et des symptômes de maladies et qu'il pourrait être nécessaire de prolonger la période d'observation afin d'évaluer l'importance d'une infection détectée pendant un essai. On trouve des énoncés similaires dans ARLA (2001). Aucun de ces documents ne décrit la procédure à suivre pour mesurer et surveiller l'infectivité pendant un essai.

Il existe des guides distincts sur la détermination de la nature de résidus d'AAM chez des animaux ou des plantes (USEPA, 1996cc,dd), de même que des lignes directrices sur les méthodes d'analyse (USEPA, 1996ee,ff) de la série 885 sur les pesticides microbiens. Il ressort de l'examen de ces documents que les procédures d'analyse servant à quantifier l'infectivité sont nombreuses et qu'elles sont fonction de la nature du micro-organisme infectieux en cause. Il revient au déclarant de fournir les méthodes d'analyse qui conviennent à cette quantification, méthodes qui doivent être relativement simples, rapides, spécifiques et efficaces (USEPA, 1996ee,ff).

L'USEPA a publié un certain nombre de méthodes d'essai biologique applicables aux pesticides microbiens et conçues pour évaluer l'infectivité tout autant que la pathogénicité et/ou la toxicité de ceux-ci (USEPA, 1996a). Dans son document d'information relatif aux essais sur des organismes non visés, l'USEPA (1996b) précise ce qui suit :

*Les organismes d'essai doivent faire l'objet d'examen visant à détecter toute infection ou tout effet connexe à des micro-organismes pendant la durée de l'étude et au terme de l'essai. La vérification de la présence ou de l'absence d'infection constitue l'aspect le plus difficile de cette exigence.*

D'après l'USEPA (1996b), les méthodes générales d'évaluation de l'infectivité peuvent inclure l'histopathologie, la sérologie ou l'analyse d'hybridation de l'acide nucléique, de même que le ré-isollement et l'identification des micro-organismes à partir des tissus. La confirmation d'une infection virale peut exiger le recours à diverses techniques, dont l'histopathologie, l'immunohistochimie et la sérologie. Selon la nature de l'agent infectieux à l'étude, les techniques sérologiques disponibles vont d'essais traditionnels d'agglutination dans le cas des bactéries à des méthodes plus complexes comme les essais d'amplification en chaîne par polymérase. Au Canada, des laboratoires privés et des laboratoires régionaux subventionnés par l'État offrent des services spécialisés de diagnostic sérologique et autre. Le site Internet de l'American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (<http://www.aavld.org/>) fournit des renseignements utiles sur les techniques et services de diagnostic actuellement disponibles en Amérique du Nord.

Pour les essais au niveau I sur des invertébrés ou des vertébrés aquatiques, l'USEPA (1996d,e,g) indique que le rapport sur les résultats des essais doit inclure « une description détaillée des mesures prises pour évaluer la dissémination, la réplication ou la survie des micro-organismes dans les tissus, organes ou liquides organiques des animaux d'essai ». Pour les études au niveau III du cycle biologique des poissons, l'USEPA (1996h) mentionne que le rapport doit renfermer des renseignements sur l'isolement, l'identification et la numération des micro-organismes responsables de tout effet pathogène observé. Dans le cas des essais au niveau I sur des plantes terrestres non visées, l'USEPA (1996c) précise qu'il convient de poursuivre les observations pendant au moins deux ans et d'analyser les racines, le feuillage, les fruits, les tissus vasculaires, etc., à la fin de l'étude en vue de détecter, à l'aide de méthodes spécifiques et efficaces, la présence du micro-organisme à l'étude. En ce qui a trait aux essais au niveau I sur des oiseaux exposés à un pesticide microbien par voie orale ou par inhalation, l'USEPA (1996k,l) indique que les rapports d'autopsie et ceux sur les histopathologies apparentes devraient inclure les résultats du ré-isolement du micro-organisme infectieux à partir des tissus examinés, ré-isolement réalisé à l'aide de techniques appropriées. Pour ce qui est des essais au niveau III portant sur les effets pathogènes *chroniques* sur les oiseaux et les effets touchant leur reproduction, l'USEPA (1996m) prescrit d'inclure dans le rapport des renseignements sur le ré-isolement, à la fin de l'essai, de micro-organismes à partir de tissus organiques choisis, de même qu'une évaluation de l'importance clinique de tels isollements. Quant aux essais de toxicité *aiguë* sur des rongeurs exposés à des pesticides microbiens par voie orale ou par inhalation, l'USEPA (1996o,q) indique que la concentration du micro-organisme dans certains tissus, organes et liquides organiques (dont les reins, le cerveau, le foie, les poumons, la rate, le sang et des ganglions lymphatiques représentatifs) devrait être déterminée pendant l'essai et à la fin de celui-ci. L'agence recommande de procéder à des analyses similaires de l'infectivité lors d'autres essais de toxicité aiguë (USEPA, 1996r) et d'essais de toxicité chronique (USEPA, 1996u) sur des rongeurs exposés à des pesticides microbiens.

Conformément aux lignes directrices de la série 885 (USEPA, 1996a-v) sur les pesticides microbiens, les modes opératoires normalisés qu'utilisent les laboratoires privés recommandent ou exigent

fréquemment, mais pas dans tous les cas, d'inclure la mesure de l'infectivité dans les *protocoles* d'essai. Ainsi, les protocoles applicables aux abeilles domestiques et à d'autres insectes ne font généralement pas mention d'une telle mesure, ce qui s'explique par l'absence de directives dans USEPA (1996i,j) sur la mesure de l'infectivité au cours d'essais sur des invertébrés terrestres non visés.

Aux fins de la LCPE 1999, les micro-organismes ou les produits microbiens qui ont ou peuvent avoir un effet nocif sur l'environnement sont considérés comme « toxiques aux termes de la LCPE », que cet effet soit attribuable à leur pathogénicité et/ou à leur toxicité (v. section 2). Dans EC et SC (2001), la section 4.2.7, intitulée « Informations relatives aux effets écologiques du micro-organisme », décrit les exigences en matière de renseignements et d'essais sur la mesure de la toxicité et/ou de la pathogénicité, mais ne renferme aucune indication quant aux procédures connexes de mesure de l'infectivité; les renseignements exigés à l'égard des effets écologiques du micro-organisme sont décrits à l'alinéa 5a) de l'annexe XV du *Règlement sur les RSN*. Cependant, le sous-alinéa 1f)(ii) de cette annexe précise qu'il faut fournir des renseignements sur « [l']infectivité, [la] pathogénicité vis-à-vis des espèces non humaines, [la] toxicité et [la] toxinogénicité » du micro-organisme à l'étude. Les méthodes d'essai biologique décrites aux sections 9 à 14 du présent guide n'exigent donc pas l'inclusion d'essais d'infectivité. Néanmoins, il pourrait être utile de recueillir des renseignements sur l'infectivité du micro-organisme dans le cadre de certaines de ces méthodes afin de se conformer aux exigences du sous-alinéa 1f)(ii). En outre, de tels renseignements pourraient faciliter l'interprétation des résultats des essais sur les effets écologiques d'une nouvelle substance microbienne et permettre de déterminer si ces effets, le cas échéant, peuvent être attribuables à une action pathogène et/ou toxique en lien avec la matière d'essai.

Il est recommandé de mesurer l'infectivité dans le cadre des essais sur des plantes ou invertébrés aquatiques ou terrestres ou sur des vertébrés aquatiques lorsque la méthode d'essai biologique permet d'obtenir une quantité suffisante d'homogénat de tissus, d'organes ou de corps entiers aux fins de

l'analyse<sup>39</sup>. Il faut aussi que la méthode d'analyse utilisée pour quantifier l'infectivité pendant l'essai ou à la fin de celui-ci soit relativement simple, rapide, spécifique et efficace (USEPA, 1996e,ff); cette méthode doit aussi être normalisée et donner des résultats probants dont le degré de précision est acceptable. Enfin, le ou les responsables de l'essai devraient connaître les coûts de ces analyses avant de les entreprendre<sup>40</sup>. Si les techniques d'analyse le permettent, les essais sur des vertébrés terrestres (p. ex., oiseaux ou rongeurs) doivent inclure, au terme de l'essai, la mesure de l'infectivité à partir d'organes, de tissus ou de liquides organiques choisis; il serait souhaitable d'effectuer d'autres mesures de l'infectivité pendant le déroulement de l'essai afin de déterminer à quel moment l'infection débute et de suivre sa progression (ou la clairance). Il pourrait être nécessaire de prévoir, dans le plan d'expérience, des répétitions supplémentaires à cette fin.

Lorsqu'un essai comporte la mesure de l'infectivité, les analyses pourraient être restreintes, à la fin de l'essai, aux homogénats de tissus, d'organes ou de corps entiers d'organismes d'essai représentant chaque traitement, une fois terminées les observations et la mesure des paramètres biologiques connexes à ces organismes. Dans le cas des méthodes d'essai biologique exigeant la détermination de la masse sèche des organismes d'essai à la fin de l'expérience, la mesure de l'infectivité réalisée alors devrait être fondée sur les répétitions supplémentaires incluses à cette fin dans le plan de l'étude (auquel cas les groupes de ces répétitions serviraient à la mesure de l'infectivité plutôt que d'être séchés et pesés). Si l'on souhaite mesurer l'infectivité pendant le déroulement de l'essai, des répétitions supplémentaires de chaque traitement devraient être prévues dans le plan de l'étude et réservées à cet usage<sup>41</sup>.

---

<sup>39</sup> La quantité d'homogénat risque de ne pas être suffisante dans le cas d'essais sur des micro-crustacés pélagiques, comme les daphnies (section 10), ou sur de petits invertébrés terrestres, comme les collemboles (*arthropodes*) (section 13).

<sup>40</sup> Il est possible qu'un déclarant possède déjà suffisamment de renseignements sur l'infectivité du micro-organisme pour satisfaire aux exigences du sous-alinéa 1f)(ii) de l'annexe XV du *Règlement sur les RSN* (Gouvernement du Canada, 1997); il est également possible qu'il n'ait pas besoin de déterminer si les effets écologiques de la matière d'essai sont attribuables à sa pathogénicité et/ou à sa toxicité. Dans de tels cas, l'inclusion de mesures de l'infectivité dans une méthode d'essai biologique ne sera peut-être ni nécessaire ni justifiée.

---

<sup>41</sup> Si des signes cliniques d'effets nocifs sont observés pendant ou après l'exposition à une nouvelle substance microbienne donnée, il pourrait être judicieux ou nécessaire de procéder à des évaluations progressives de l'infectivité. Il faudrait alors prélever des échantillons de tissus ou d'organes choisis en vue de l'isolement du microbe pendant les essais de pathogénicité et/ou de toxicité menés en laboratoire.



## Principes de bonnes pratiques de laboratoire

### Repères

- *Les Principes de bonnes pratiques de laboratoire (BPL) de l'OCDE devraient être appliqués pendant tout essai visant à mesurer en laboratoire la pathogénicité et/ou la toxicité d'une nouvelle substance microbienne conformément au présent guide.*
- *Ces principes sont résumés sous les rubriques suivantes :*
  1. *Organisation et personnel de l'installation d'essai*
  2. *Programme d'assurance de la qualité*
  3. *Installations*
  4. *Appareils, matières et réactifs*
  5. *Systèmes d'essai*
  6. *Substances d'essai*
  7. *Modes opératoires normalisés*
  8. *Réalisation de l'étude*
  9. *Établissement du rapport sur les résultats de l'étude*
  10. *Stockage et conservation des archives et des matières*

Les exigences en matière d'essai sont définies comme suit aux paragraphes 31(1) et 31(2) du *Règlement sur les RSN* (Gouvernement du Canada, 1997) pris en application de la LCPE 1999 :

- 31(1) *Les conditions et les procédures d'essai pour l'obtention des données d'essai à l'égard d'une substance afin de respecter les exigences en matière de fourniture de renseignements visés à l'article 81 de la Loi ou l'obligation de fournir des renseignements conformément à l'alinéa 84(1)c) de la Loi doivent être conformes à celles énoncées dans les « Lignes directrices de l'OCDE pour les essais », constituant l'annexe 1 des Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, établies par l'Organisation de coopération et de développement économiques le 12 mai 1981, qui sont actualisées au moment de l'obtention des données d'essai.*
- 31(2) *Les pratiques de laboratoire pour l'obtention des données d'essai visées au paragraphe (1) doivent être conformes à celles énoncées dans les « Principes de l'OCDE relatifs aux*

*bonnes pratiques de laboratoire », constituant l'annexe 2 des Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, établis par l'Organisation de coopération et de développement économiques le 12 mai 1981.*

Les données d'essai mentionnées dans ces paragraphes excluent celles sur les micro-organismes vivants; les exigences en matière d'essai concernant ces derniers sont définies dans la partie II.1 du *Règlement sur les RSN*. Il n'en demeure pas moins que les Principes de BPL devraient être appliqués aux essais sur des organismes vivants (y compris les micro-organismes) tant que la Loi et/ou le *Règlement sur les RSN* n'incluront pas d'exigences relatives aux données sur ces organismes.

Le Conseil de l'OCDE a adopté les annexes 1 et 2 des *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques* en 1981. Après de nombreuses années d'utilisation, des pays membres de l'Organisation, dont le Canada, ont estimé qu'il fallait revoir et actualiser les Principes de BPL de l'OCDE. Un groupe d'experts comptant des représentants de 25 pays (dont le Canada) et de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) a élaboré les *Principes de BPL révisés de l'OCDE*; le Conseil de l'OCDE a adopté ceux-ci le 26 novembre 1997 et a officiellement modifié l'annexe II de la décision du Conseil de 1981. Les *Principes de BPL révisés de l'OCDE* ont été publiés en 1998 (OCDE, 1998a); ils sont assortis de 12 documents connexes (OCDE, 1995a,b,c,d, 1998b, 1999a,b,c,d,e, 2000a, 2002a)<sup>42</sup>.

Les Principes de BPL de l'OCDE s'appliquent aux essais de sécurité non cliniques de diverses substances, dont des produits chimiques industriels,

<sup>42</sup> On peut télécharger ces documents à partir de l'adresse <http://www.oecd.org/ehs/>. On peut également se procurer des exemplaires imprimés auprès de l'Unité de surveillance de la conformité aux BPL – LCPE, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, 335 River Road, Ottawa (Ont.) K1A 0H3. Pour acheter ces documents, s'adresser à la Direction de l'environnement de l'OCDE, Division des publications sur l'environnement, la santé et la sécurité, 2, rue André-Pascal, 75775 Paris, Cedex 16, France; télécopieur : (33-1) 45 24 16 75; courriel: [ehscont@oecd.org](mailto:ehscont@oecd.org).

des pesticides et des substances renfermant des organismes vivants ou constituées d'organismes vivants (OCDE, 1998a). L'ARLA (Santé Canada) a publié la Directive d'homologation intitulée *Bonnes pratiques de laboratoire* (ARLA, 1998) pour les essais de produits antiparasitaires permettant de recueillir des données sur l'innocuité de ces produits pour la santé humaine ou l'environnement; cette directive est conforme aux documents de l'OCDE (1998a et autres documents de la série). Les laboratoires qui mènent des essais de pathogénicité et/ou de toxicité de nouvelles substances microbiennes aux fins des exigences réglementaires en matière de renseignements (EC et SC, 2001) devraient également observer les Principes de BPL de l'OCDE.

La présente section vise à faire connaître au lecteur et aux parties intéressées (p. ex., les déclarants, le personnel chargé de l'application de la loi, les consultants en environnement et les laboratoires d'essai) certains des principes de base des BPL à appliquer lors de la préparation et de la mise en route des essais sur les effets écologiques possibles de nouvelles substances microbiennes sur des plantes et des animaux aquatiques ou terrestres. Ces principes sont décrits en détail à la section II du guide n° 1 de l'OCDE (1998a) relatif aux BPL. Les autres documents de la série sont centrés sur des aspects particuliers des BPL :

- *Guides révisés pour les systèmes de vérification du respect des Bonnes pratiques de laboratoire* (n° 2; OCDE, 1995a)
- *Directives révisées pour la conduite d'inspections de laboratoire et de vérification d'études* (n° 3; OCDE, 1995b)
- *Assurance qualité et BPL* (n° 4; OCDE, 1999a)
- *Respect des Principes de BPL par les fournisseurs d'équipements de laboratoire* (n° 5; OCDE, 1999b)
- *Application des Principes de BPL aux études sur le terrain* (n° 6; OCDE, 1999c)
- *Application des Principes de BPL aux études à court terme* (n° 7; OCDE, 1999d)

- *Rôle et responsabilités du directeur de l'étude dans les travaux sur les BPL* (n° 8; OCDE, 1999e)
- *Directives pour la préparation de rapports d'inspection en matière de BPL* (n° 9; OCDE, 1995c)
- *Application des Principes de BPL aux systèmes informatiques* (n° 10; OCDE, 1995d)
- *Le rôle et les responsabilités du donneur d'ordre lors de l'application des Principes de BPL* (n° 11; OCDE, 1998b)
- *Recommandations concernant la demande et la réalisation d'inspection et de vérifications d'études dans un autre pays* (n° 12; OCDE, 2000a)
- *Application des Principes de BPL de l'OCDE à l'organisation et la conduite des études multi-site* (n° 13; OCDE, 2002a)

Certains de ces documents (p. ex., n°s 6, 12 et 13) ne s'appliquent pas au présent contexte, tandis que d'autres (p. ex., n°s 2, 3, 5 et 9) sont d'intérêt secondaire en ce sens qu'ils portent sur des questions comme les procédures de surveillance du respect des BPL, la conformité des fournisseurs d'équipements de laboratoire ou les inspections et vérifications associées aux BPL. On trouvera des orientations qui font autorité dans les guides susmentionnés qui sont le plus pertinents.

### **6.1 Organisation et personnel de l'installation d'essai**

Selon l'OCDE (1998a), la direction de toute installation d'essai doit veiller au respect des Principes de BPL lors de la mise en route d'un essai. Elle devrait s'assurer de l'existence, dans le rapport de l'essai, d'une déclaration qui désigne la ou les personnes exerçant les responsabilités de gestion. Ces responsabilités incluent la définition, l'approbation et l'utilisation de modes opératoires normalisés pertinents et techniquement valides dans la mise en œuvre de chaque méthode d'essai, de même que diverses autres activités connexes dont se charge le personnel de laboratoire (v. § 6.7). La direction devrait également veiller à l'existence d'un programme d'assurance de la qualité (v. § 6.2) doté d'un personnel spécifiquement affecté, à l'intérieur de

l'établissement, à la vérification et à la surveillance du rendement de chaque essai, conformément aux Principes de BPL. Avant le début de chaque étude, la direction devrait désigner comme *directeur de l'étude* une personne possédant les qualifications, la formation et l'expérience requises.

Les responsabilités du directeur sont décrites à la sous-section 1.2 de OCDE (1998a). Un document distinct de l'OCDE porte uniquement sur le rôle et les responsabilités du directeur de l'étude dans les travaux sur les BPL (n° 8; OCDE, 1999e). Comme il est indiqué dans ces deux documents, le directeur de l'étude, qui représente le seul « point de contrôle » de l'étude, assume la responsabilité finale du déroulement scientifique global de l'étude. À cet égard, il a pour fonction de surveiller les aspects scientifiques, administratifs et réglementaires de l'étude en coordonnant les contributions du personnel de direction et du personnel scientifique/technique, ainsi que celles du programme d'assurance de la qualité. Sur le plan scientifique, le directeur de l'étude est généralement le scientifique responsable de la conception du plan de l'étude et de son approbation; il est également chargé de superviser la collecte des données, leur analyse et l'établissement des rapports. Il lui incombe de tirer les conclusions générales de l'étude lors de son achèvement. Le directeur de l'étude est également chargé de veiller au respect de la réglementation et de s'assurer que l'étude est réalisée conformément aux Principes de BPL. Sa signature doit être apposée sur le rapport final de l'étude (OCDE, 1998a, 1999e).

Les responsabilités qui incombent au *responsable principal des essais* et au personnel de l'étude en matière de Principes de BPL sont décrites aux sous-sections 1.3 et 1.4 de OCDE (1998a).

## 6.2 Programme d'assurance de la qualité

L'OCDE définit un programme d'assurance de la qualité comme « un système précis, englobant le personnel correspondant, qui est indépendant de la conduite de l'étude et vise à donner à la direction de l'installation d'essai l'assurance que les [...] Principes de [BPL] sont bien respectés » (OCDE, 1998a, 1999a). La direction d'une installation d'essai a la responsabilité de s'assurer de l'existence d'un programme d'assurance de la qualité faisant appel à tout document utile, doté d'un personnel désigné; elle doit aussi veiller à ce que les fonctions soient

assumées conformément aux Principes de BPL (v. § 6.1). En outre, elle doit « vérifier que le directeur de l'étude a mis le plan de l'étude approuvé à la disposition du personnel chargé de l'assurance [de la] qualité » (OCDE, 1998a, 1999a).

Le programme d'assurance de la qualité doit être confié à une ou des personnes, responsables devant la direction, qui ont l'expérience des méthodes d'essai. Ces personnes ne doivent pas participer à la conduite de l'étude. Leurs responsabilités sont les suivantes (OCDE, 1999a) :

- (i) conserver des copies de tous les plans d'étude et modes opératoires normalisés approuvés qui sont utilisés dans l'installation d'essai, y compris les versions à jour de tout mode opératoire normalisé;
- (ii) vérifier que le plan de l'étude (y compris la documentation) contient les informations nécessaires au respect des Principes de BPL;
- (iii) procéder à des inspections pour déterminer si toutes les études se déroulent conformément aux Principes de BPL;
- (iv) examiner les rapports finals afin de confirmer que les méthodes, les modes opératoires et les observations sont fidèlement et entièrement décrits et que les résultats consignés reflètent de façon exacte et complète les *données brutes* des études;
- (v) rendre compte promptement par écrit de tout résultat d'inspection à la direction et au directeur de l'étude, ainsi qu'au ou aux responsables principaux des essais, le cas échéant;
- (vi) rédiger et signer une déclaration qui sera insérée dans le rapport final et qui précisera la nature des inspections et les dates auxquelles elles ont eu lieu, y compris la ou les phases de l'étude inspectées, de même que la ou les dates auxquelles les résultats des inspections ont été communiqués à la direction et au directeur de l'étude, ainsi qu'au ou aux responsables principaux des essais, le cas échéant.

Le directeur responsable en dernier ressort des BPL doit être clairement identifié. La personne nommée responsable de l'assurance de la qualité doit avoir un

accès direct aux différents échelons de la direction, notamment au niveau hiérarchique le plus élevé de l'installation d'essai. Normalement, le personnel chargé de l'assurance de la qualité n'intervient pas dans la rédaction des modes opératoires normalisés; il serait toutefois souhaitable qu'il examine ces derniers avant leur application, afin de déterminer s'ils sont clairs et conformes aux Principes de BPL. On trouve dans OCDE (1999a) des indications sur la réalisation d'inspections et de vérifications aux fins de l'assurance de la qualité.

Les Principes de BPL exigent l'inclusion d'une déclaration signée d'assurance de la qualité dans le rapport final. Cette déclaration précise la nature des inspections et les dates auxquelles elles ont eu lieu, y compris la ou les phases de l'étude inspectées, ainsi que la ou les dates auxquelles les résultats des inspections ont été communiqués à la direction, au directeur de l'étude et au ou aux responsables principaux des essais. Le mode de présentation de la déclaration varie selon la nature du rapport. L'OCDE (1999a) recommande de ne remplir cette déclaration que si la revendication de conformité aux BPL faite par le directeur de l'étude peut être étayée.

Dans les petites installations d'essai, il peut être difficile pour la direction d'affecter du personnel à la seule assurance de la qualité; toutefois, au moins une personne doit être responsable à titre permanent (même à temps partiel) de la coordination de la fonction d'assurance de la qualité. On peut admettre que des personnes participant à des études menées dans le cadre des BPL exercent des fonctions d'assurance de la qualité pour des études soumises aux BPL conduites dans d'autres services de l'installation d'essai. On peut également admettre le recours à du personnel extérieur à l'installation d'essai pour assumer les fonctions liées à l'assurance de la qualité, à condition que soit garantie l'efficacité nécessaire pour répondre aux Principes de BPL (OCDE, 1999a).

### 6.3 Installations

La section II(3) de OCDE (1998a) décrit les Principes de BPL applicables aux installations d'essai. Ceux-ci portent sur la conception générale et l'agencement des locaux, les installations réservées aux essais, à la manutention et au stockage, les salles d'archives et l'évacuation des déchets.

L'agencement de l'installation d'essai doit permettre une séparation suffisante des différents essais et activités, de manière à assurer une exécution adéquate de chaque étude. Le nombre de salles ou de locaux doit être suffisant pour assurer la séparation des systèmes d'essai, ainsi que des essais eux-mêmes, des substances et des organismes. L'installation d'essai doit disposer de salles ou de locaux appropriés pour le diagnostic, le traitement et le contrôle des maladies.

Les salles ou aires de stockage des *substances d'essai* doivent être séparées des salles ou locaux abritant les systèmes d'essai. Elles doivent permettre le maintien de l'identité, de la concentration, de la pureté et de la stabilité de ces substances et assurer un stockage sûr des substances dangereuses. En prévision des essais, il doit exister des salles ou des locaux distincts pour la réception des substances d'essai, de même que pour leur mélange, leur manipulation et leur préparation (en tant que concentrations expérimentales).

Il faut prévoir des salles d'archives pour le stockage et la consultation en toute sécurité des plans d'étude, des données brutes, des rapports finals, des échantillons des substances d'essai et des spécimens. La conception technique de ces salles doit protéger le contenu contre toute détérioration induite.

La manutention et l'évacuation des déchets doivent s'effectuer de manière à ne pas mettre en péril l'intégrité des études. Il faut pour cela disposer d'installations permettant de collecter, de stocker et d'évacuer les déchets de façon appropriée, de même que définir les procédures de décontamination et de transport.

### 6.4 Appareils, matières et réactifs

La Section II(4) de OCDE (1998a) décrit les Principes de BPL applicables aux appareils, aux matières et aux réactifs utilisés pendant une étude. Le document de consensus révisé n° 5, intitulé *Respect des Principes de BPL par les fournisseurs d'équipements de laboratoire* (OCDE, 1999b), fournit de plus amples détails sur :

- les normes et programmes d'agrément,
- la nourriture, la litière et l'eau pour les animaux,

- les systèmes informatiques et les logiciels d'application,
- les substances de référence,
- l'inspection et l'étalonnage des instruments; la stérilisation des matières,
- la certification des réactifs généraux,
- le choix des détergents et désinfectants,
- l'information sur les substances nécessaires aux essais microbiologiques.

Le document de consensus n° 10, intitulé *Application des Principes de BPL aux systèmes informatiques* (OCDE, 1995d), fournit des indications détaillées sur l'utilisation et la validation du matériel informatique et des logiciels utilisés pour produire, mesurer ou évaluer des données à des fins réglementaires, conformément aux Principes de BPL.

Selon la Section II(4) de OCDE (1998a), les appareils, notamment les systèmes informatiques validés, utilisés pour l'obtention, le stockage et la consultation des données et pour la régulation des facteurs d'environnement qui interviennent dans l'étude, doivent occuper un emplacement adéquat, être de conception appropriée et avoir une capacité suffisante. Les appareils doivent être périodiquement inspectés, nettoyés, entretenus et étalonnés conformément aux modes opératoires normalisés. On conservera des relevés de ces activités. Les appareils et matières ne doivent pas interférer de façon préjudiciable avec le ou les systèmes d'essai. Il faut étiqueter les produits chimiques, réactifs et solutions et en mentionner la nature (avec la concentration, le cas échéant), la date limite d'utilisation et les conditions de stockage. Il faut disposer d'informations sur l'origine, la date de préparation et la stabilité de ces substances.

L'OCDE (1999b) indique qu'il incombe à l'utilisateur des substances nécessaires aux essais microbiologiques (c.-à-d. des substances microbiennes) de veiller, par des dispositions prises avec le fournisseur, à ce que l'étiquetage de celles-ci mentionne au moins les indications suivantes : origine, identité, date de production, date de péremption, conditions de stockage. Le fournisseur veillera à fournir la documentation prouvant qu'il est

agréé sous une forme ou sous une autre. En l'absence de système national d'agrément, il doit fournir à l'utilisateur un document de validation prouvant que le produit est conforme à la description donnée sur l'étiquette.

La « validation » d'un système informatique, c'est-à-dire la démonstration qu'il est adapté aux tâches auxquelles il est destiné, joue un rôle déterminant (OCDE, 1995d). Cette opération doit entrer dans le cadre d'un programme de validation exécuté avant la mise en service du système. Les considérations qui facilitent l'application des Principes de BPL aux systèmes informatiques sont décrites dans OCDE (1995d) sous les titres suivants :

- responsabilités,
- formation,
- installations et équipement,
- maintenance et reprise après un sinistre,
- données,
- sécurité,
- validation des systèmes informatiques,
- documentation,
- archives.

### 6.5 *Systèmes d'essai*

La section II(5) de OCDE (1998a) décrit les Principes de BPL applicables aux systèmes d'essai. Les appareils utilisés pour l'obtention de données chimiques et physiques doivent occuper un emplacement adéquat, être de conception appropriée et avoir une capacité suffisante. L'intégrité des systèmes d'essai physique et chimique doit être vérifiée.

Il faut créer et maintenir des conditions convenables pour le stockage, le logement, la manipulation et l'entretien des systèmes d'essai biologique, et ce, afin de s'assurer de la qualité des données. Les animaux et végétaux récemment reçus qui serviront d'organismes d'essai (ou de cultures en vue de leur propagation) doivent être isolés jusqu'à ce que leur état sanitaire ait

été évalué. Si l'on observe une mortalité ou une *morbidité* anormale, les sous-lots reçus ne doivent pas être utilisés dans les études; s'il y a lieu, ils doivent être détruits d'une manière humanitaire. Au début de l'étude, les organismes d'essai doivent être exempts de toute maladie ou symptôme qui pourrait interférer avec l'objectif ou le déroulement de l'étude. Il faut tenir des registres mentionnant l'origine, la date d'arrivée et l'état à l'arrivée des organismes d'essai (ou des cultures). Ceux-ci doivent être acclimatés à l'environnement d'essai pendant une période suffisante avant la première administration de la substance d'essai. Tous les renseignements nécessaires à une identification adéquate des systèmes d'essai biologique (p. ex., les enceintes expérimentales) doivent figurer sur leur logement ou leur récipient. Pendant leur utilisation (ou avant et après), les logements ou récipients des systèmes d'essai biologique doivent être nettoyés et désinfectés. Toute matière venant au contact d'un système d'essai biologique ne doit pas contenir de contaminants à des concentrations qui interféreraient avec l'étude.

## 6.6 Substances d'essai

La section II(6) de OCDE (1998a) décrit les Principes de BPL applicables à la réception, à la manipulation, à l'échantillonnage, au stockage et à la caractérisation des substances d'essai (dont les substances de référence). Il faut tenir des registres mentionnant la date de réception de chaque substance d'essai, la date limite d'utilisation et les quantités reçues et utilisées dans les études. Il faut aussi définir des méthodes de manipulation, d'échantillonnage (sous-échantillonnage) et de stockage visant à assurer le maintien de l'homogénéité et de la stabilité des échantillons dans toute la mesure du possible et à éviter toute contamination ou mélange de ceux-ci. Le ou les récipients de stockage doivent porter les renseignements suivants : identification, date limite d'utilisation et instructions particulières de stockage. Chaque substance d'essai, y compris toute substance de référence, doit être identifiée correctement (p. ex., numéro de lot, pureté, composition, pourcentage de viabilité, concentrations ou autres caractéristiques propres à chaque lot). Lorsque la substance d'essai est fournie par le donneur d'ordre, il doit exister un mécanisme, défini en coopération par ce dernier et l'installation d'essai, qui permet de vérifier l'identité de cette substance.

Pour chaque étude, il faut connaître la stabilité des substances d'essai et des substances de référence dans les conditions de stockage et d'essai. Si la substance d'essai est administrée dans un véhicule (porteur), il faut déterminer l'homogénéité, la concentration et la stabilité de la substance dans ce véhicule. Un échantillon (sous-échantillon) de chaque lot de la substance d'essai sera conservé à des fins d'analyse pour toutes les études, à l'exception des études à court terme.

## 6.7 Modes opératoires normalisés

Conformément à la section II(7) de OCDE (1998a), une installation d'essai doit posséder des modes opératoires normalisés écrits, approuvés par la direction de l'installation, qui ont pour but d'assurer la qualité et l'intégrité des données obtenues par cette installation. La direction doit également approuver toute révision des modes opératoires normalisés. Des ouvrages, méthodes d'analyse, articles et manuels publiés peuvent servir de compléments aux modes opératoires normalisés.

Conformément aux Principes de BPL de l'OCDE, on doit disposer de modes opératoires normalisés pour les catégories suivantes d'activités ou d'éléments connexes dans une installation d'essai (cette liste n'est pas limitative) :

- les substances d'essai,
- la manipulation et le maintien des appareils, matières et réactifs,
- l'établissement des rapports et l'enregistrement, le stockage et la consultation des données,
- les systèmes informatiques (validation, exploitation, entretien, sécurité, sauvegarde),
- le système d'essai (y compris l'entretien de l'installation d'essai, des enceintes expérimentales et des organismes d'essai),
- les procédures d'assurance de la qualité (OCDE, 1998a).

## 6.8 Réalisation de l'étude

La section II(8) de OCDE (1998a) décrit les Principes de BPL applicables à la réalisation de l'étude, notamment le plan de celle-ci et son contenu.

Un plan écrit doit être disponible avant le début de l'étude. Ce plan doit être approuvé par le directeur de l'étude, qui le date et le signe, et sa conformité aux BPL doit être vérifiée par le personnel d'assurance de la qualité. Les amendements apportés au plan de l'étude doivent être justifiés et approuvés par le directeur de l'étude, qui les date et les signe, puis conservés avec le plan de l'étude. Les déviations du plan de l'étude doivent être décrites, expliquées, déclarées et datées en temps utile par le directeur de l'étude et par le ou les responsables principaux des essais, puis conservées avec les données brutes de l'étude. Pour les études à court terme, on peut utiliser un plan général d'étude accompagné d'un complément spécifique de l'étude considérée (OCDE, 1999d).

Le plan de l'étude doit comporter les renseignements suivants, dont la liste n'est pas limitative :

- identification de l'étude et des substances d'essai (dont les substances de référence),
- renseignements sur le donneur d'ordre et l'installation d'essai (nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation, du directeur de l'étude et du responsable principal des essais),
- dates (dont la date d'approbation du plan d'étude signé par le donneur d'ordre, la direction du laboratoire et le directeur de l'étude; dates proposées pour le début et la fin de l'expérimentation),
- méthodes d'essai (indication de la méthode d'essai biologique ou des lignes directrices à utiliser),
- points particuliers (p. ex., justification du choix de la méthode d'essai, caractérisation du système d'essai, dose/concentration, y compris la fréquence et la durée de l'administration de celle-ci, renseignements détaillés sur la conception de l'expérience),
- enregistrements (liste des comptes rendus qu'il faut conserver).

## 6.9 Établissement du rapport sur les résultats de l'étude

Les Principes de BPL de l'OCDE visent également les rapports sur les résultats d'études de laboratoire. Conformément à la section II(9) de OCDE (1998a), il faut établir un rapport pour chaque étude. Dans le cas des études à court terme, un rapport final normalisé pourra être préparé et être assorti, le cas échéant, d'un complément particulier à l'étude<sup>43</sup>. Les responsables principaux des essais ou les scientifiques participant à l'étude doivent signer et dater leurs rapports. De plus, le directeur de l'étude doit signer et dater le rapport final afin d'indiquer qu'il assume la responsabilité de la validité des données. Le degré de conformité avec les Principes de BPL de l'OCDE doit être indiqué. Les corrections et additions apportées à un rapport final doivent se présenter sous forme d'amendements précisant les raisons sous-jacentes aux modifications. Le directeur de l'étude doit également signer et dater ces amendements. Le rapport final doit comporter une identification de l'étude et des substances d'essai (dont les substances de référence). Il convient de fournir des détails sur la caractérisation de la substance d'essai, notamment sa pureté, sa stabilité et son homogénéité. Le nom et l'adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai, du directeur de l'étude et du ou des responsables principaux des essais doivent être précisés, de même que le nom et l'adresse d'autres chercheurs ayant contribué à l'établissement du rapport final. Les dates de début et d'achèvement de l'expérimentation doivent être indiquées. Le rapport final doit renfermer une déclaration sur le programme d'assurance de la qualité énumérant les types d'inspections réalisées et leurs dates, ainsi que les dates auxquelles les résultats des inspections ont été communiqués à la direction, au directeur de l'étude et au ou aux responsables principaux des essais<sup>44</sup>. Il doit également comporter

<sup>43</sup> Le document n° 7 (1999d) de l'OCDE renferme des directives plus détaillées sur l'application des Principes de BPL aux études à court terme. Ces dernières y sont définies en termes généraux, et on y indique qu'elles peuvent différer notablement des études de toxicité chronique et des études de courte durée. Cette définition englobe la notion selon laquelle une étude à court terme est réalisée de façon courante à l'aide de méthodes normalisées. Les études à court terme incluent celles sur la *toxicité aiguë* et celles sur l'*écotoxicité aiguë* (OCDE, 1999d).

<sup>44</sup> Dans le cas d'une étude à court terme, les inspections peuvent se limiter aux procédés et être réalisées périodiquement afin de vérifier des procédures ou processus de nature répétitive. Elles sont généralement

une description des matières et des méthodes utilisées, un résumé des résultats, toutes les informations et les données demandées par le plan de l'étude, un exposé des résultats, comprenant les calculs et les déterminations statistiques, une évaluation et un examen des résultats et, s'il y a lieu, des conclusions. En outre, le rapport final doit préciser le ou les lieux où le plan de l'étude, les échantillons (sous-échantillons) des substances d'essai et des substances de référence, les spécimens, les données brutes et le rapport final doivent être conservés (OCDE, 1998a).

### **6.10 Stockage et conservation des archives et des matières**

La Section II(10) de OCDE (1998a) décrit les Principes de BPL applicables au stockage et à la conservation des archives et des matières. Parmi les éléments qui seront conservés dans les archives pendant la période spécifiée par les autorités compétentes, on compte :

- le plan de l'étude, les données brutes, les échantillons (sous-échantillons) des substances d'essai (y compris les substances de référence) et le rapport final de chaque étude,
- des rapports sur toutes les inspections réalisées conformément au programme d'assurance de la qualité,

- les relevés des qualifications, de la formation, de l'expérience et des descriptions des tâches du personnel,
- des comptes rendus et des rapports relatifs à l'entretien et à l'étalonnage de l'équipement,
- les documents relatifs à la validation des systèmes informatiques (v. OCDE, 1995d),
- le dossier chronologique de tous les modes opératoires normalisés.

Lorsque des échantillons (sous-échantillons) de substances d'essai sont éliminés, pour quelque raison que ce soit, avant l'expiration de la période de conservation requise, cette élimination doit être justifiée et étayée par des documents. Les échantillons et spécimens ne doivent être conservés qu'aussi longtemps que la qualité de la préparation en permet l'évaluation. Le matériel conservé dans des archives sera indexé de façon à en faciliter le stockage et la consultation méthodiques. Seul le personnel autorisé par la direction du laboratoire aura accès aux archives. Toute entrée et sortie de matériel archivé doit être correctement consignée. Si une installation d'essai ou un dépôt d'archives cesse ses activités et n'a pas de successeur légal, les archives doivent être remises au donneur d'ordre de l'étude (OCDE, 1998a).

---

effectuées de manière aléatoire; elles ont lieu lorsqu'un procédé (c.-à-d. la même méthode d'essai biologique) est très fréquemment mis en œuvre dans un laboratoire et qu'il n'apparaît ni efficace ni judicieux de mener des inspections portant sur les études (OCDE, 1999d).



## Biosécurité en laboratoire, soin et utilisation des animaux

Cette section porte sur deux éléments importants de la manipulation de micro-organismes infectieux et des essais avec ceux-ci : 1) la sécurité des travailleurs; 2) le soin et l'utilisation des animaux. On trouvera des renseignements et des orientations faisant autorité à ces égards dans des documents clés publiés par des organismes canadiens (SC, 2001; CCPA, 1993). Ces sujets sont traités brièvement ici dans le but premier d'attirer l'attention du lecteur et de l'inciter à consulter les documents connexes. Les pages qui suivent font également état de questions ayant trait à la protection des travailleurs et aux essais sur des animaux en laboratoire.

### 7.1 Biosécurité en laboratoire

#### Repères

- *Le personnel de laboratoire devrait connaître les Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire (SC, 2001, ou éditions subséquentes) et les observer dans toute activité — manipulation, essai et confinement — faisant appel à des micro-organismes infectieux.*
- *Il convient de se conformer aux directives qui suivent sur les sujets suivants : choix du niveau approprié de confinement; manipulation de substances potentiellement infectieuses dans des installations adéquates et désignées; exigences en matière de pratiques opérationnelles minimales pour chaque niveau de confinement; conception du laboratoire et exigences physiques; processus de mise en service, d'homologation et de réhomologation du laboratoire; exigences relatives à la production de micro-organismes à grande échelle et/ou aux travaux à grande échelle sur des micro-organismes; risques sanitaires associés aux animaux d'expérimentation; lignes directrices choisies pour les travaux présentant des dangers particuliers; décontamination; utilisation d'enceintes de sécurité biologique.*

Santé Canada a publié deux éditions de ses *Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire* afin d'aider les laboratoires à concevoir des politiques et programmes de biosécurité applicables à la manipulation et au confinement de micro-organismes infectieux, de même qu'aux essais avec ces organismes. La troisième édition, qui tient compte des principes et pratiques actuels de biosécurité et de

bioconfinement, a été diffusée sous forme de version préliminaire (SC, 2001)<sup>45</sup>. Le personnel de laboratoire qui procède à des essais sur les effets écologiques de nouvelles substances microbiennes devrait connaître les *Lignes directrices* précitées et les observer dans toute activité — manipulation, essai et confinement — où ces substances sont utilisées.

Il incombe à tous les employés de laboratoire, de même qu'à leurs superviseurs et aux directeurs du laboratoire, de mettre à profit l'information qu'elles renferment, et ce, d'une manière avertie et rigoureuse (SC, 2001). Il est possible de réduire au minimum les *risques* associés à la manipulation de substances microbiennes infectieuses en appliquant les principes et les pratiques appropriés de biosécurité et de confinement. Il faut porter une grande attention à la biosécurité en laboratoire à toutes les étapes de la manipulation d'une nouvelle substance microbienne ou d'une concentration expérimentale de celle-ci, de même qu'au cours des essais<sup>46</sup>.

Les pages qui suivent portent sur certaines des recommandations et exigences que l'on trouve dans les *Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire* (SC, 2001); elles renferment également un résumé des sujets qui y sont abordés. On devrait consulter ce document pour y trouver de plus amples détails et des conseils faisant autorité.

#### Sécurité biologique (chapitre 2)

- Choix du niveau de confinement qui convient au micro-organisme visé<sup>47</sup>.

<sup>45</sup> Cette troisième édition (de même que les révisions subséquentes et la version finale mises à la disposition du public) est accessible sur Internet à l'adresse <http://www.hc-sc.gc.ca> : sous « Recherche », taper « Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire ».

<sup>46</sup> SC (2001) cite des cas d'infections contractées en laboratoire par suite de la manipulation de micro-organismes infectieux ou d'essais avec ceux-ci; ces infections ont été mortelles dans certains cas.

<sup>47</sup> Quatre niveaux de confinement sont définis : 1) le niveau 1 ne requiert aucune caractéristique spéciale autre que celles qui conviennent à un laboratoire fonctionnel et bien conçu; 2) le niveau 2 nécessite le recours à des dispositifs de confinement primaires comme les enceintes de sécurité biologique, de même que

- Nécessité d'évaluer les risques au moment du choix du niveau de confinement.
- Désignation d'un agent de la sécurité biologique et description de ses tâches et responsabilités.

### **Manipulation des substances infectieuses (chapitre 3)**

- Voies d'exposition et incidents susceptibles d'entraîner une infection.
- L'exposition aux aérosols pourrait constituer le plus grand risque biologique pour les employés de laboratoire. Conseils sur la façon de réduire au minimum la formation d'aérosols.
- Description des pratiques générales exigées pour tous les laboratoires où sont manipulées des substances infectieuses.
- Description des pratiques minimales opérationnelles applicables au niveau de confinement 2, en plus des pratiques générales exigées.
- Description des pratiques minimales opérationnelles applicables au niveau de confinement 3, en plus des pratiques générales exigées pour le niveau de confinement 2.
- Description des pratiques minimales opérationnelles applicables au niveau de confinement 4, en plus des pratiques générales exigées pour les niveaux de confinement 2 et 3.
- Nécessité, pour chaque laboratoire, d'adopter des pratiques de sécurité afin de réduire au minimum les possibilités qu'une personne non autorisée

---

l'utilisation d'un équipement approprié de protection individuelle et d'appareils de décontamination (autoclaves); 3) le niveau 3 exige des mesures supplémentaires de protection respiratoire (c.-à-d. la filtration par filtre HEPA de l'air sortant du laboratoire et la restriction de l'accès au laboratoire); 4) le niveau 4, qui est le niveau de confinement maximal, inclut des unités isolées et scellées, la protection des travailleurs par le port d'une combinaison pressurisée ou au moyen d'enceintes de sécurité biologique de catégorie III, des systèmes spéciaux de filtration de l'air et de décontamination des effluents. On trouvera des indications sur le choix des niveaux de confinement appropriés sur le site Web du Bureau de la sécurité des laboratoires (Santé Canada), à l'adresse <http://www.hc.sc.gc.ca/hpb/lcdc/biosafety>.

entre dans le laboratoire ou les zones d'entreposage, ou que des matières infectieuses sortent du laboratoire sans autorisation.

### **Conception du laboratoire et exigences physiques (chapitre 4)**

- Conception et aménagement des laboratoires pour chacun des quatre niveaux de confinement.
- Exigences pour chaque niveau : emplacement du laboratoire et accès; revêtements de finition des surfaces (c.-à-d. revêtements de sols, de murs et de plafonds, scellants) et mobilier de rangement; traitement de l'air – chauffage, ventilation et conditionnement d'air; périmètre de confinement; services (c.-à-d. eau, gaz, électricité et sécurité).

### **Mise en service, homologation et réhomologation (chapitre 5)**

- La *mise en service* d'une installation permet de vérifier que les caractéristiques de conception et de construction de celle-ci sont conformes aux exigences des codes et des normes applicables à l'intention des plans et devis.
- Pour s'assurer qu'il répond aux exigences physiques associées au niveau spécifié de confinement et à l'usage prévu des installations, chaque laboratoire doit être soumis à un processus détaillé de mise en service.
- Nécessité de vérifier l'intégrité de la pièce pour l'homologation des installations des niveaux de confinement 3 ou 4; liste des éléments à vérifier pour chaque niveau.
- Nécessité de mettre en service les diverses composantes du système de traitement de l'air d'une pièce en confinement.
- Nécessité de vérifier l'efficacité des filtres HEPA installés dans les laboratoires de niveau de confinement 3 et 4.
- Conformité des conduits de soufflage et d'extraction d'air aux critères d'acceptation.
- Description de la façon de vérifier le fonctionnement de l'équipement de laboratoire et de divers dispositifs.

### **Production de micro-organismes à grande échelle (chapitre 6)**

- La production à grande échelle et le traitement d'agents nécessitant un niveau de confinement 3 pourraient présenter de graves risques pour les personnes qui travaillent à l'intérieur ou près du laboratoire, les animaux gardés à l'intérieur ou près du laboratoire, ou le milieu environnant.
- Précautions particulières à prendre lors de la manipulation de grandes quantités (p. ex., plus de 10 L) de suspensions liquides infectieuses ou susceptibles de l'être, de même qu'au cours des essais avec celles-ci.
- Absence de définition d'exigences spécifiques pour les recherches à grande échelle ou la production d'organismes viables correspondant au niveau de confinement 4. Ces exigences doivent être établies au cas par cas.
- Détails sur les pratiques opérationnelles à grande échelle et les exigences physiques pour les niveaux de confinement 1, 2 et 3.
- Pour les procédés de production à grande échelle, exigences minimales à respecter en plus de celles correspondant au niveau de confinement du laboratoire.

### **Animaux de laboratoire (chapitre 7)**

- Travailler avec des animaux pose des risques particuliers, notamment l'exposition à des agents infectieux (naturels ou produits en laboratoire), morsures et égratignures, allergies et problèmes physiques (comme le bruit et la température).
- L'exposition à des allergènes peut être réduite au minimum par des mesures d'ingénierie, la ventilation, le recours à des systèmes de confinement et le port de dispositifs de protection respiratoire et d'autres pièces d'équipement de protection individuelle.
- Les locaux où se fait le travail avec de petits animaux doivent être aménagés et utilisés conformément aux *Normes sur le confinement des installations vétérinaires* (ACIA, 2001) et au *Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation* (CCPA, 1993).

- Nécessité de séparer les animaleries des lieux où s'effectuent les autres activités de laboratoire; idéalement, elles devraient être situées dans une unité distincte.
- Nécessité d'élaborer pour chaque projet des protocoles spécifiques d'entrée et de sortie pour le personnel scientifique, les soigneurs, les animaux, les substances d'essai (et leurs concentrations), l'équipement, la nourriture, les excréments et les déchets.

### **Lignes directrices relatives aux risques particuliers (chapitre 8)**

- La plupart des travaux de recombinaison de l'ADN et de manipulation génétique ne posent aucun risque spécifique en matière de sécurité pour les travailleurs; toutefois, certaines manipulations génétiques laissent entrevoir un risque important.
- Certains documents expliquent comment évaluer les risques associés à la recherche sur l'ADN recombinant, mais ils sont nécessairement très généraux.
- Facteurs à prendre en compte pour déterminer le niveau de confinement d'un organisme recombinant.
- Nécessité d'évaluer en détail le niveau de risque associé au maintien et à la manipulation de chaque nouvelle lignée primaire (culture) de micro-organismes en laboratoire afin de déterminer le niveau de précautions à prendre. Des indications sont fournies sur ce sujet. La lignée microbienne doit être manipulée selon le niveau de confinement correspondant au degré de risque déterminé lors de l'évaluation préalable.
- Risques associés à des types spécifiques de lignées microbiennes (p. ex., virale ou fongique, non mammalienne ou mammalienne).
- Risques connexes aux travaux sur des micro-organismes toxigènes et pratiques à appliquer dans ce contexte; procédures et solutions de décontamination applicables aux toxines.
- Mesures de sécurité à prendre en lien avec les travaux sur les mycobactéries. Description des

niveaux de confinement stratifiés applicables à des manipulations particulières. Mesures de sécurité à prendre (vêtements de protection, appareils de protection respiratoire, douches); directives concernant la désinfection au cours de travaux avec des mycobactéries.

- Lignes directrices de confinement pour les travaux avec des arthropodes. Risques reliés aux vecteurs de maladie pour les humains. Orientations générales et éléments à prendre en considération relativement à la sécurité biologique lors de travaux avec des insectes : niveaux de confinement et manipulation des arthropodes, mesures à prendre lorsque des arthropodes s'échappent, vérification de l'intégrité du système.

### Décontamination (chapitre 9)

- Décontamination par stérilisation et désinfection.
- Liste de divers décontaminants et efficacité de ceux-ci.
- Responsabilités de chaque employé de laboratoire dans les domaines suivants : utilisation de décontaminants avant la mise aux rebuts d'une substance contaminée; enlèvement du matériel et de l'équipement des zones de confinement; échantillonnage; manipulation; lavage des vêtements; décontamination des surfaces et des locaux; nettoyage des déversements de matières infectieuses.
- Nécessité d'élaborer et d'observer un protocole spécifique pour chaque technique de décontamination.
- Nécessité de former les employés quant aux techniques de décontamination propres à leurs activités.
- Indications sur la décontamination efficace dans un autoclave.
- Indications sur le choix et l'utilisation de désinfectants chimiques.
- Indications sur la décontamination gazeuse des locaux, les systèmes de traitement des effluents liquides, l'irradiation, l'incinération et les nouvelles technologies.

### Enceintes de sécurité biologique (chapitre 10)

- Utilisation d'enceintes de sécurité biologique aux fins d'un confinement primaire pour le travail avec des agents pathogènes.
- Applications des enceintes de sécurité biologique : opérations qui présentent un risque de production d'aérosols infectieux et travaux avec des concentrations élevées ou des volumes importants de matières infectieuses.
- Nécessité de former les employés quant à l'utilisation adéquate des enceintes de sécurité biologique.
- Catégories d'enceintes et choix, installation et homologation de celles-ci.
- Procédures applicables avant, pendant et après le travail dans une enceinte.

### 7.2 Soins et utilisation des animaux

#### Repères

- *Pour les travaux de laboratoire sur des animaux, il convient de se fonder sur la publication la plus récente du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) (1993 ou édition subséquente) sur le soin et l'utilisation d'animaux d'expérimentation.*
- *Le document du CCPA est axé sur le soin et l'utilisation de mammifères gardés en laboratoire à des fins d'expérimentation, mais on y traite aussi d'autres vertébrés, dont des oiseaux et des poissons.*
- *On trouvera dans ce guide des indications sur les sujets suivants : conception des animaleries et des cages; réglages du milieu (p. ex., température, humidité, ventilation, éclairage); influence de variables environnementales comme le bruit, les produits chimiques, la litière et la densité de population; transport et acclimatation des animaux; soins des animaux; entretien des installations; besoins sociaux et comportementaux; immobilisations et manipulations; santé et sécurité au travail; contrôle de la douleur chez les animaux; anesthésie; euthanasie.*

Au Canada, tout soin et toute utilisation expérimentale d'animaux doivent satisfaire aux exigences du CCPA, une organisation nationale

d'évaluation par les pairs fondée à Ottawa en 1968 (CCPA, 1993). Le Conseil a pour mandat de « travailler à l'amélioration du soin et de l'utilisation des animaux [partout au] Canada ».

En 1993, le CCPA a publié la deuxième édition de son *Manuel sur le soin et l'utilisation d'animaux d'expérimentation*. Ce manuel renferme des directives applicables aux essais visant à mesurer les effets écologiques de nouvelles substances microbiennes sur les animaux. Les pages qui suivent résument certains des sujets, recommandations ou exigences que renferme le Manuel quant au soin des animaux soumis à des essais de laboratoire. On devrait consulter ce document pour y trouver de plus amples détails et des conseils faisant autorité<sup>48</sup>. Ce document est axé sur le soin et l'utilisation de mammifères, mais on y traite aussi d'autres vertébrés, dont des oiseaux et des poissons. Pour le moment, le programme du CCPA n'inclut pas de directives sur le soin et l'utilisation d'invertébrés aquatiques et terrestres d'expérimentation.

### **Installations pour les animaux d'expérimentation (chapitre II)**

- Lignes directrices sur l'aménagement d'animaleries.
- Les installations animalières devraient être situées dans des endroits où il y a un minimum d'accès par le public ou de circulation. Un accès direct de l'extérieur est souhaitable. Il faut restreindre l'accès aux installations.
- Les locaux devraient être conçus pour qu'ils soient faciles à entretenir. Ils devraient être séparés de ceux où ont lieu les expériences, et leur dimension devrait être basée sur les espèces à héberger.
- La grandeur des cages choisies pour héberger une espèce animale doit convenir à cette espèce. On choisira des cages à fond plein pour les rongeurs, à moins de contre-indication en raison de la nature des études.

### **Le milieu (chapitre III)**

- Description de la conception, de l'optimisation et de la surveillance des réglages du milieu des animaleries, dont les systèmes de réglage de la température, de l'humidité, de la ventilation et de l'éclairage.
- Du fait que les exigences du milieu varient selon l'espèce animale et le protocole expérimental, les installations pour les animaux doivent être conçues de façon à permettre des rajustements.
- Le contrôle du bruit dans les animaleries devrait être pris en compte lors de la conception des installations et du choix de l'équipement et faire l'objet de bonnes pratiques de gestion.
- Il faut surveiller les produits chimiques auxquels les animaux sont exposés de diverses façons (p. ex., par le biais de l'eau, de l'air, des aliments, de la litière ou des surfaces de contact). L'accumulation d'ammoniac attribuable à de mauvaises pratiques d'élevage soulève des préoccupations particulières.
- Recommandations sur le choix des matériaux de litière et du fond de cage.
- La densité de population et la taille des groupes maintenus dans des cages peuvent influencer grandement sur les résultats des expériences.
- Contrôle microbiologique dans les animaleries : lorsque c'est possible, l'état de santé des animaux devrait être établi avant que ceux-ci ne soient amenés dans l'installation, puis surveillé régulièrement par la suite. On doit renseigner le personnel sur les précautions à prendre pour éviter d'introduire des maladies dans l'installation.
- Description des pratiques ayant pour objet de réduire la propagation d'agents infectieux dans une installation conventionnelle ou de prévenir une telle propagation dans une installation « barrière ».
- Confinement des risques biologiques : on doit confiner les animaux exposés à des micro-organismes infectieux connus. Conception et exploitation des unités des maladies infectieuses.

<sup>48</sup> On trouvera la version intégrale de CCPA (1993) sur le site Web du Conseil (<http://www.ccac.ca>), de même que des informations sur la façon de commander le Manuel et d'autres publications connexes.

### Soin des animaux d'expérimentation (chapitre V)

- Nécessité de mettre en place, dans toutes les animaleries, des modes opératoires normalisés pour le soin des animaux. Tous les animaux doivent être observés au moins une fois par jour.
- Description des procédures de manipulation adéquate et « en douceur » des animaux.
- Pratiques recommandées pour la réception et la manipulation d'animaux arrivant à l'installation. Conditionnement ou mise en quarantaine (c.-à-d. isolement des autres animaux dans un local distinct) des nouveaux animaux.
- Identification adéquate de chaque groupe d'animaux hébergés et gardés dans l'installation.
- Conseils sur la qualité et l'entreposage des aliments, sur la qualité de l'eau et l'approvisionnement en eau, de même que sur l'exercice physique des animaux d'expérimentation.
- Entretien des animaleries : nettoyage et mesures sanitaires, enlèvement des déchets, lutte contre la vermine.
- En règle générale, on doit placer les animaux dans des cages fraîchement nettoyées au moins une fois par semaine.
- Nécessité de veiller au soin des animaux durant les fins de semaine et les congés. Le soin des animaux est une responsabilité continue et quotidienne.

### Besoins sociaux et comportementaux des rongeurs et des lapins (section G du chapitre VI)

- Il est souhaitable de placer au moins deux souris ou rats par cage. Il y a souvent incompatibilité entre les souris ou les lapins mâles parvenus à maturité sexuelle et placés deux par cage.
- On devrait envisager de placer dans les cages des moyens d'enrichissement (p. ex., pour les souris, bouteilles de plastique vides; pour les lapins, planches de repos sous lesquels ils peuvent se cacher).

- Recommandations quant à la conception des cages, à la superficie à prévoir par animal, aux litières et à l'utilisation de cages pourvues d'un fond plein.
- Un niveau de bruit élevé (p. ex., 50 à 70 décibels ou plus), une intensité lumineuse et/ou une *photopériode* inadéquates, des variations soudaines du taux d'humidité, un renouvellement insuffisant de l'air, un nettoyage peu fréquent des cages et la perturbation de la routine quotidienne influent sur le bien-être des rongeurs et des lapins.

### Pratiques spéciales (chapitre VII)

- Recommandations quant aux conditions et procédures applicables à l'acquisition d'animaux.
- Il faut se procurer les animaux d'expérimentation auprès d'un fournisseur accrédité. Ce dernier devrait fournir, sur demande, des informations détaillées sur les techniques de surveillance de l'état de santé des animaux et sur les pratiques d'élevage et de gestion.
- Lois et règlements sur le transport humanitaire des animaux.
- Description des facteurs de stress pendant le transport, et conseils pour réduire ceux-ci.
- Il est essentiel que les animaux amenés dans le laboratoire puissent s'habituer à leur nouvel environnement. Avant d'utiliser les animaux dans les expériences, il faut absolument les acclimater à leur milieu et les stabiliser au point de vue physiologique et comportemental.
- Éléments à prendre en compte dans l'élevage d'animaux en laboratoire.
- Description de la manipulation et de l'immobilisation « en douceur » des animaux pendant certaines opérations. Lignes directrices générales sur le soin des animaux immobilisés. Surveillance spéciale des animaux immobilisés et dispositifs d'immobilisation réduisant le stress des animaux.
- Directives sur le prélèvement d'échantillons de sang chez les mammifères et les oiseaux d'expérimentation.

### Santé et sécurité au travail (chapitre VIII)

- Toutes les personnes qui travaillent avec des animaux doivent savoir comment manipuler ceux-ci, pour leur propre santé et sécurité comme pour celles des animaux.
- Les personnes qui travaillent avec les animaux d'expérimentation sont susceptibles d'être exposées à des risques physiques (p. ex., chaleur, bruit), chimiques (p. ex., désinfectants, solutions de nettoyage), à des parasites intestinaux, entérobactéries et organismes pathogènes, de même qu'à des morsures d'animaux.
- Nécessité d'élaborer et d'appliquer des lignes directrices et des modes opératoires normalisés en matière de biosécurité.
- Certains micro-organismes infectieux peuvent traverser les barrières d'espèces et infecter les humains. La sensibilisation des employés de laboratoire, des soins vétérinaires adéquats et le respect des modes opératoires normalisés applicables au contrôle des agents infectieux permettent généralement d'éviter la transmission des infections des animaux aux humains (c.-à-d. les *zoonoses*).
- Il pourrait être nécessaire de vacciner les membres du personnel avant le début de travaux qui présentent des risques d'infection par des micro-organismes, si des vaccins sont disponibles; il faudrait aussi prévoir des installations de confinement pour ces travaux (p. ex., niveau de confinement 4; v. § 7.1, note de bas de page 47).
- Les allergies aux animaux d'expérimentation représentent un problème de santé important pour les personnes qui travaillent régulièrement avec les espèces d'expérimentation usuelles. Description des symptômes et des mesures permettant de réduire le degré d'exposition aux allergènes animaux.
- Conseils sur la réduction des blessures et des risques de nature chimique pour le personnel responsable de la manipulation des animaux.

### Contrôle de la douleur chez les animaux (chapitre X)

- L'évaluation et le contrôle de la douleur et de la souffrance des animaux sont un défi auquel il faut faire face si l'on veut traiter ces derniers de façon éthique et humanitaire. En plus des considérations éthiques, la douleur et la détresse ajoutent des variables indésirables dans la recherche, variables qui peuvent fausser l'interprétation des résultats de l'étude.
- Une des caractéristiques de la douleur ou de la détresse chez les animaux est le changement de comportement. Le personnel animalier et les chercheurs doivent bien connaître les caractéristiques comportementales des animaux d'expérimentation, car le succès ou l'échec d'une étude peut dépendre de l'habileté des techniciens qui observent les animaux à minimiser la douleur et la détresse.
- La présence ou l'absence de stress semble être le seul indicateur acceptable du bien-être des animaux.
- La formation et la compétence vétérinaires jouent un rôle essentiel en ce qui a trait à la prévention et à la diminution de la douleur et de la souffrance chez tous les animaux utilisés en recherche, en enseignement et dans les essais.
- Description de certains changements dans le comportement et dans l'apparence physique des rongeurs, lapins, oiseaux et poissons, changements qui permettent de déterminer si un animal éprouve des douleurs ou subit un stress.

### Anesthésie (chapitre XI)

- Directives et informations sur l'anesthésie et le soulagement de la douleur chez les animaux d'expérimentation.
- Nécessité d'utiliser des sédatifs, des *analgésiques* ou des *anesthésiques* généraux pour diminuer la douleur et l'angoisse, à moins que les objectifs de l'étude n'en interdisent l'usage.
- La manipulation des animaux et le jeûne, en combinaison avec l'anesthésie, sont décrits.

- Utilisation de divers tranquillisants et sédatifs, d'anesthésiques généraux convenant aux mammifères et aux oiseaux et de relaxants musculaires (parallèlement aux anesthésiques dans ce dernier cas). L'utilisation d'agents bloquants neuromusculaires est à proscrire.
- Considérations associées à l'anesthésie applicable à chaque espèce animale.
- Description des analgésiques convenant aux lapins, aux rongeurs, aux oiseaux et aux poissons, notamment, des procédures à appliquer et des précautions à prendre.

### **Euthanasie (chapitre XII)**

- Dans un laboratoire, la mise à mort d'un animal doit être « humaine », c'est-à-dire qu'elle doit être sans douleur, engendrer un minimum de peur et d'anxiété, être fiable, reproductible, irréversible, simple, sûre et rapide.
- Dix critères pour une mort humaine sont énoncés.
- Aucun animal ne doit être déclaré mort à moins que ses réflexes moteurs et les mouvements cardiaques et respiratoires n'aient cessé.
- Parmi les méthodes d'*euthanasie* humaine par des moyens physiques, on compte l'abattage d'un coup violent sur la tête (étourdissement), la luxation cervicale, l'électrocution, la décébration, la décapitation, l'abattage à l'arme à feu, la macération, l'irradiation par micro-ondes et l'exsanguination.
- Description des procédures humaines de mise à mort par injection d'une surdose d'anesthésique.
- Description des procédures d'euthanasie au moyen d'une surdose d'anesthésique (p. ex., éther, halothane, méthoxyflurane) par inhalation. Il n'est plus recommandé d'utiliser le chloroforme.
- Description des procédures d'euthanasie faisant appel à des gaz non anesthésiques (p. ex., monoxyde de carbone, gaz carbonique, azote, argon ou cyanure). On ne recommande pas l'usage du monoxyde de carbone ni du cyanure du fait qu'ils présentent des problèmes de sécurité; en outre, le cyanure provoque des convulsions et des tremblements avant la mort.
- Des directives particulières sont fournies pour l'euthanasie de diverses espèces, dont les poissons, les amphibiens et les reptiles.



## Choix des organismes d'essai et des méthodes d'essai biologique

### Repères

- *L'annexe XV du Règlement sur les RSN exige jusqu'à six méthodes d'essai biologique distinctes pour la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne. Ces essais portent sur une plante aquatique, un invertébré aquatique, un vertébré aquatique, une plante terrestre, un invertébré terrestre et un vertébré terrestre, respectivement.*
- *Dans chaque cas, une méthode d'essai biologique normalisée devrait être appliquée si elle est disponible et si elle convient. Cette méthode devrait être adaptée aux besoins et permettre de mesurer les effets tant pathogènes que toxiques d'une nouvelle substance microbienne.*
- *Lors du choix de la ou des méthodes d'essai biologique à appliquer à des plantes, invertébrés ou vertébrés (poissons) aquatiques, il faut déterminer s'il convient d'utiliser des organismes dulcicoles et/ou des organismes estuariens ou marins. Les éléments à prendre en compte sont l'expression environnementale et le devenir des micro-organismes présents dans la matière d'essai, l'influence que peut exercer la salinité sur ces organismes, les régions où l'on prévoit appliquer la matière d'essai et la probabilité que celle-ci pénètre dans les eaux intérieures ou côtières à des concentrations susceptibles d'être préoccupantes. Il est tout aussi important de tenir compte du caractère mésophile ou psychrophile de la nouvelle substance microbienne.*
- *Le choix de l'espèce de plante terrestre est fonction de différents facteurs, dont les conclusions d'études antérieures menées sur le terrain ou en laboratoire quant aux cultures sensibles à la nouvelle substance microbienne, ainsi que les résultats signalés pour des micro-organismes appartenant à des genres semblables.*
- *Le choix de la ou des méthodes d'essai qui conviennent à des invertébrés terrestres dépend des éléments suivants : la probabilité d'exposition d'espèces présentant un intérêt écologique; l'existence de méthodes d'essai normalisées pour des espèces représentatives; la nature de la matière d'essai; la biologie du micro-organisme présent dans cette dernière; l'effet possible de toute altération génétique du micro-organisme; le mode prévu de dispersion ou de pénétration de la matière d'essai dans l'environnement terrestre. Il faut aussi tenir compte des conclusions d'études antérieures*

*menées sur des invertébrés terrestres exposés à la matière d'essai ou à une matière renfermant des micro-organismes semblables (c.-à-d. appartenant au même genre), que ce soit sur le terrain ou en laboratoire.*

- *Pour la mesure des effets d'une nouvelle substance microbienne sur des vertébrés terrestres, on peut utiliser des oiseaux ou de petits mammifères. Il est recommandé d'utiliser des canards colverts ou des colins de Virginie pour les essais sur les oiseaux, et des rats ou des souris pour les essais sur les petits mammifères. Au moment du choix de l'essai ou des essais sur des oiseaux et/ou de petits mammifères, on tiendra compte de la nature de la nouvelle substance microbienne, de la probabilité que des oiseaux ou de petits mammifères soient exposés lors de l'application de la substance sur le terrain, de même que des conclusions sur la sensibilité relative des oiseaux ou des petits mammifères.*

### 8.1 Les six catégories de méthodes d'essai biologique

Les sous-sections 8.2 à 8.7 décrivent six catégories distinctes de *méthodes d'essai biologique* qui sont fonction du type d'organisme (plantes aquatiques, invertébrés aquatiques, vertébrés aquatiques, plantes terrestres, invertébrés terrestres, vertébrés terrestres). Chaque sous-section fait état des essais que le ou les responsables devraient envisager lors du choix des méthodes d'essai biologique qui permettront de mesurer et d'évaluer les effets écologiques de nouvelles substances microbiennes en vue de se conformer aux exigences de l'annexe XV du *Règlement sur les RSN*. Des indications sont également fournies sur les conditions et procédures applicables aux méthodes d'essai biologique de chaque catégorie, méthodes que l'on recommande d'utiliser pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité d'une nouvelle substance microbienne.

Pour de nombreuses applications, le *Règlement sur les RSN* exige du déclarant qu'il fournisse des données sur les effets écologiques que peut avoir une nouvelle substance microbienne sur des espèces de plantes, d'invertébrés et de vertébrés qui sont représentatifs des milieux aquatique et terrestre. Cette exigence a conduit à l'établissement de six catégories

de méthodes d'essai biologique qui, utilisées en laboratoire selon des conditions et procédures normalisées, permettent de détecter et de mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes (v. section 2).

Conformément au *Règlement sur les RSN*, il peut être nécessaire d'appliquer jusqu'à six méthodes d'essai biologique distinctes à chaque nouvelle substance microbienne à l'étude.

Dans certains cas, le déclarant n'a pas à effectuer d'essais sur chacune des six catégories d'organismes d'essai (hôtes), par exemple lorsqu'il existe déjà des données d'essai pertinentes pour certains organismes hôtes (p. ex., des rongeurs) exposés au micro-organisme à déclarer ou à des micro-organismes étroitement apparentés. Environnement Canada peut également accorder une dérogation à l'obligation de fournir des renseignements sur les effets écologiques d'une nouvelle substance microbienne si ces renseignements ne sont pas nécessaires pour déterminer si, aux termes de la LCPE, le micro-organisme vivant est toxique ou susceptible de le devenir. Une dérogation peut aussi être accordée s'il est peu pratique ou irréalisable d'obtenir les données nécessaires pour recueillir cette information (EC et SC, 2001). Toutefois, s'il n'existe pas de données d'essai historiques et qu'une dérogation n'est pas applicable, le déclarant devrait prendre des mesures pour qu'une série appropriée d'essais de pathogénicité et/ou de toxicité sur des organismes hôtes soit effectuée dans le cadre du processus de déclaration.

Les principaux paramètres biologiques de la plupart des essais monospécifiques normalisés servant à mesurer en laboratoire la toxicité de produits chimiques sont l'inhibition de la croissance, l'inhibition de la reproduction, des modifications morphologiques d'organismes entiers, des changements comportementaux et la mortalité (effets aigus ou chroniques). Ces mêmes paramètres peuvent dénoter une réaction à la maladie, à la condition que l'essai dure suffisamment longtemps pour que la réaction ait lieu. En conséquence, un ensemble soigneusement choisi de méthodes d'essai biologique normalisées (modifiées au besoin pour tenir compte d'effets pathogènes) permettra de mesurer adéquatement les effets tant pathogènes que toxiques de nouvelles substances microbiennes. Au besoin —

et si une telle procédure est applicable<sup>49</sup> —, on pourrait intégrer dans certaines méthodes des examens sommaires et histologiques des organismes d'essai; ces examens, menés au terme de l'expérience, pourraient servir à diagnostiquer les dommages aux organes et tissus et à signaler la fréquence d'observation de ces dommages.

## 8.2 Méthodes d'essai biologique recommandées et autres méthodes

Il est conseillé d'utiliser systématiquement des méthodes normalisées (modifiées au besoin) pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité de nouvelles substances microbiennes aux fins du *Règlement sur les RSN*, ce qui permettra de s'assurer que les essais sont rigoureux, probants et comparables. L'utilisation de procédures « spéciales », c'est-à-dire autres que les méthodes normalisées (ou modifiées adéquatement), peut causer de nombreux problèmes si le but visé est d'obtenir des résultats probants et comparables à des fins réglementaires<sup>50</sup>. Souvent, de telles procédures ne comportent pas de critères sur lesquels on peut se fonder pour juger de la validité et de l'acceptabilité des résultats. En outre, elles ne s'accompagnent généralement pas d'instructions explicites sur certaines conditions d'essai qui leur sont associées, comme des détails sur les conditions environnementales et les procédures qui doivent être

<sup>49</sup> Il existe certaines contraintes pour ce qui est des méthodes d'essai biologique visant un organisme d'essai pour lequel les procédures d'autopsie ne sont pas bien définies et/ou pour lequel la différence entre des tissus et organes sains ou infectés, observés au microscope ou sommairement, n'a pas été établie.

<sup>50</sup> Des chercheurs ont eu recours à des procédures axées sur la recherche afin de relever les effets pathogènes et/ou toxiques de divers micro-organismes sur des espèces données de plantes, d'invertébrés ou de vertébrés aquatiques ou terrestres [v. Douville (2001), qui renferme un examen de la documentation scientifique la plus récente sur ce sujet]. De tels travaux sont utiles du fait qu'ils illustrent les différents types d'effets et de réponses observés lorsqu'une espèce et un stade biologique donnés d'un organisme d'essai (hôte) sont exposés à un type spécifique de micro-organisme dans certaines conditions de laboratoire définies. Toutefois, à défaut d'une méthode normalisée convenant à une application généralisée en laboratoire, la valeur de ces procédures est limitée. Par exemple, les procédures axées sur la recherche qui sont décrites dans la documentation scientifique ne comportent pas d'étapes rigoureuses de mise au point et de validation des méthodes, étapes qui sont exigées par les organismes de réglementation responsables de la publication de méthodes d'essai biologique éprouvées et acceptées.

normalisées pour que les résultats soient considérés comme valides à une échelle plus vaste (c.-à-d. réglementaire) aux fins de l'évaluation des effets écologiques d'une matière d'essai en particulier. Les modes opératoires normalisés qu'utilisent certains laboratoires d'essai pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité d'un pesticide microbien peuvent ne pas convenir à une application généralisée à de nouvelles substances microbiennes aux fins des exigences en matière de renseignements sur les effets écologiques de celles-ci, conformément à l'annexe XV du *Règlement sur les RSN*<sup>51</sup>.

Les indications fournies dans le présent guide sont axées sur l'utilisation d'une série de méthodes d'essai biologique normalisées, choisies avec soin et adaptées à la mesure des effets tant pathogènes que toxiques de nouvelles substances microbiennes. Le recours à des méthodes ou procédures de rechange non courantes (et, dans certains cas, non normalisées) plutôt qu'à celles recommandées ici peut s'avérer contre-productif. Il existe toutefois des exceptions justifiant l'application d'autres méthodes ou procédures en plus (ou à la place) des méthodes d'essai biologique recommandées<sup>52</sup>. Par exemple, on pourrait considérer comme une exception les préoccupations que soulèvent d'autres études montrant les effets nocifs d'un type similaire de micro-organisme sur une espèce aquatique ou terrestre qui présente un intérêt commercial et/ou écologique et qui est susceptible d'être exposée à la nouvelle substance microbienne.

---

<sup>51</sup> L'absence d'évaluation par les pairs d'un mode opératoire normalisé établi à l'interne par un laboratoire d'essai, de même que l'absence d'évaluation interlaboratoires du rendement de ce mode à l'aide d'une matière d'essai ou plus, selon les mêmes conditions et procédures normalisées qui y sont décrites, limitent également l'acceptation et l'utilisation généralisées de ce mode opératoire en tant que solution de rechange aux méthodes d'essai biologique normalisées.

<sup>52</sup> Dans de tels cas, le déclarant devrait, avant de parachever le plan de l'étude, discuter avec un représentant de la DSN d'Environnement Canada des procédures de remplacement (ou supplémentaires) ou des méthodes d'essai non normalisées qu'il souhaite utiliser. Des détails sur la ou les raisons pour lesquelles de telles procédures ou méthodes non normalisées sont utilisées pour réunir les renseignements exigés sur les effets écologiques potentiels d'une nouvelle substance microbienne donnée devraient être fournis par écrit, de même que des précisions sur le mode opératoire normalisé qu'utilisera le laboratoire pour les essais. Il convient d'aborder ces détails lors de la consultation avant la déclaration (v. § 1.1.6)

Les méthodes d'essai biologique recommandées dans le présent guide ont été jugées convenables et appropriées en regard des exigences du *Règlement sur les RSN* relatives aux informations sur les effets écologiques de nouvelles substances microbiennes [v. section 2 du présent guide; v. aussi § 4.2.7 de EC et SC (2001)]. Elles ont été publiées par Environnement Canada ou par un autre organisme de réglementation (p. ex., USEPA) ou une autorité reconnue (p. ex., ASTM) responsable de l'élaboration de lignes directrices en matière d'essais normalisés. En règle générale, ces méthodes ont été évaluées par des pairs et soumises à une évaluation interlaboratoires (essais comparatifs) avant d'être publiées. Elles incluent des indications et des instructions sur la manipulation et la culture ou l'élevage d'organismes d'essai (hôtes), des critères à respecter en matière de santé, l'utilisation obligatoire de témoins négatifs (et, dans certains cas, d'autres témoins), de même qu'un ou des critères d'« acceptabilité des essais » servant à déterminer si les résultats d'un essai en particulier doivent être considérés comme valables et acceptables pour l'usage prévu. Les sous-sections 9.1.2, 10.1.2, 10.1.3, 10.2.2, 10.2.3, 11.1.2, 12.2, 13.2, 14.1.1 et 14.1.2 renferment des détails sur les méthodes d'essai biologique recommandées dans chacune des six catégories.

Les sous-sections 9.2.3, 10.1.4, 10.2.4, 11.1.3, 11.2.3, 12.3, 13.3, 14.1.3 et 14.2.3 décrivent d'autres méthodes ou procédures d'essai dignes d'attention, en plus (ou à la place) de celles recommandées ici. Dans certains cas, il s'agit de méthodes d'essai biologique normalisées qui pourraient être intégrées dans une série d'essais avec une nouvelle substance microbienne (v. § 1.2 et section 2). Certaines de ces « autres méthodes d'essai » peuvent convenir davantage que celles recommandées, par exemple pour des essais coûteux et exigeants en main-d'œuvre sur les effets différés ou à long terme d'une exposition à une nouvelle substance microbienne donnée. Font aussi partie des « autres méthodes ou procédures » celles non normalisées fondées sur les conclusions de certains essais axés sur la recherche faisant appel à un type particulier d'organisme hôte exposé à un micro-organisme également de type particulier. Les modes opératoires normalisés qui ont été mis au point à l'interne par un laboratoire d'essai et qui ne sont pas conformes à une méthode d'essai biologique (ou à une modification approuvée de celle-ci) sont considérés comme d'« autres méthodes

ou procédures ». Tout projet d'utilisation de méthodes ou de procédures d'essai autres que celles recommandées doit être soumis à l'examen de la DSN d'Environnement Canada au cours de la consultation avant la déclaration (v. § 1.1.6).

Certaines des « autres méthodes ou procédures » ne sont pas considérées comme des solutions de rechange adéquates aux méthodes d'essai biologique recommandées. Comme il est indiqué dans les sous-sections précitées, des lacunes comme la brièveté (p. ex., essais de toxicité aiguë de 4 jours ou moins), un ou des paramètres biologiques ou statistiques inappropriés, l'absence de critères de validité des essais ou d'autres considérations rendent inacceptables de telles méthodes ou procédures. L'existence de méthodes d'essai biologique normalisées plus adéquates a aussi influé, parfois, sur la décision de considérer comme inacceptables ces autres méthodes et procédures pour les essais associés à la déclaration de nouvelles substances microbiennes.

Le recours à une série de six méthodes d'essai biologique normalisées (il peut y en avoir plus de six ou moins de six, dans certains cas) constitue une approche valable. Chacune de ces méthodes peut être adaptée, au besoin, et servir à mesurer les effets tant pathogènes que toxiques de la nouvelle substance microbienne à l'étude, si les données le permettent<sup>53</sup>. Les six sous-sections qui suivent sur les catégories de méthodes d'essai biologique recommandées présentent une ou des méthodes à envisager lors de la conception du programme d'essais visant à mesurer les effets écologiques d'une nouvelle substance microbienne donnée, dans des conditions de laboratoire contrôlées et définies. Le choix de la ou des méthodes qui conviennent à la matière d'essai dépend d'un certain nombre de facteurs, dont le ou les modes d'application prévus de la nouvelle substance microbienne (p. ex., pulvérisation aérienne, dispersion d'une substance solide dans ou sur le sol ou l'eau), les types d'organismes les plus susceptibles d'être exposés dans l'environnement et la similarité

de ceux-ci et des organismes utilisés dans la ou les méthodes d'essai biologique recommandées.

Il convient de souligner qu'il n'a pas été démontré que toutes les méthodes normalisées recommandées aux sections 9 à 14 peuvent susciter, chez les organismes d'essai, des réactions à des substances microbiennes pathogènes. Par exemple, on dispose de très peu d'indices, sinon d'aucun indice, selon lesquels les vers de terre et les collemboles (des invertébrés) soumis aux méthodes d'essai recommandées à la sous-section 13.2 sont sensibles aux micro-organismes pathogènes. Toutefois, on considère que la durée des essais et les autres conditions décrites dans les sections 9 à 14 sont appropriées (et suffisamment longues) pour permettre la manifestation d'effets et la mesure de ceux-ci, tout en fournissant l'assurance (d'après des expériences antérieures) que les méthodes recommandées se prêtent à des essais avec des substances toxiques, y compris celles associées à des micro-organismes (p. ex., endotoxines ou métabolites toxiques). Les introductions des sections 9 à 14 renferment un bref survol des utilisations antérieures des méthodes d'essai biologique recommandées à l'heure actuelle (avec les modifications appropriées qui y sont décrites) pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes, ainsi qu'un résumé des conclusions tirées de ces expériences. À mesure que d'autres essais seront effectués, d'autres informations seront recueillies sur la mesure dans laquelle chaque méthode d'essai biologique se prête à la manifestation d'effets pathogènes (et toxiques). Il ne fait pas de doute que d'autres méthodes (ou d'autres modifications procédurales aux méthodes recommandées ici) plus appropriées verront le jour à mesure que progresseront les essais et les recherches sur les effets pathogènes et/ou toxiques de micro-organismes.

### **8.3 Essais sur des plantes, des invertébrés ou des vertébrés aquatiques**

Lors du choix de la méthode d'essai biologique qui convient à la mesure des effets nocifs d'une nouvelle substance microbienne sur des plantes, des invertébrés ou des vertébrés aquatiques, il faut tenir compte de la probabilité que des organismes dulcicoles, estuariens et/ou marins soient exposés, et ce, en fonction du ou des modes d'application prévus de la substance. Si l'application doit être restreinte à des emplacements situés à l'intérieur des terres, loin

<sup>53</sup> Le déclarant peut choisir d'autres procédures et méthodes non normalisées et les ajouter aux six méthodes d'essai biologique normalisées (ce nombre peut être plus élevé ou moins élevé, dans certains cas) (v. sections 9 à 14) en raison de la nature et du mode d'application de la nouvelle substance microbienne, de même que de préoccupations connexes à l'exposition potentielle d'une ou de plusieurs espèces de plantes ou d'animaux sensibles.

des eaux côtières, il n'est pas nécessaire de mesurer les effets de la substance sur des organismes estuariens ou marins, et seuls des essais sur des organismes dulcicoles seront envisagés. Par contre, si le mode d'application inclut des eaux d'estuaire ou de mer, ou encore des terres avoisinantes dont l'eau de drainage pénètre dans des eaux côtières, les essais devraient être limités à des organismes estuariens ou marins sensibles, ou inclure ceux-ci. Si l'application de la nouvelle substance microbienne risque d'entraîner la pénétration d'importantes concentrations de celle-ci dans des masses d'eau douce, d'eau d'estuaire ou d'eau de mer, on devrait envisager de mener des essais sur des plantes, invertébrés et vertébrés dulcicoles et sur des espèces représentatives du milieu estuarien/marin. Il faudrait aussi tenir compte des conclusions de toute étude antérieure sur l'*expression environnementale* du micro-organisme (v. section 2) lors du choix des méthodes d'essai aquatique qui conviennent. Par exemple, si une étude antérieure montre que le micro-organisme n'a pas survécu dans une eau saumâtre ou une eau de mer à sa concentration maximale, on pourrait exclure des essais les organismes estuariens ou marins pour ne retenir que les organismes dulcicoles.

Les sections 9, 10 et 11 renferment des indications sur les méthodes d'essai biologique recommandées pour les plantes, invertébrés et vertébrés dulcicoles, tandis que des sous-sections distinctes portent sur les méthodes applicables aux organismes d'essai des milieux estuarien et marin. Pour les essais sur des plantes ou des animaux aquatiques, l'influence des propriétés physiques et chimiques des eaux réceptrices (p. ex., salinité, température, éléments nutritifs) sur l'*expression environnementale* et le devenir de la nouvelle substance microbienne devrait être établie (v. § 3.1) et prise en compte. Le fait que la nouvelle substance microbienne soit constituée de micro-organismes *mésophiles* ou *psychrophiles* constitue un élément déterminant du choix du type d'essai. Par exemple, si la nouvelle substance microbienne est *mésophile* (c.-à-d. si la température doit être de  $\geq 15$  °C pour que les micro-organismes puissent croître et se multiplier), il faudrait prévoir, pour les essais aquatiques, des températures suffisamment chaudes pour ne pas inhiber l'activité microbienne. De même, si la nouvelle substance microbienne est *psychrophile* (c.-à-d. si la température doit être de  $\leq 15$  °C pour assurer la réplification des micro-organismes), les températures

devraient être suffisamment froides pour ne pas inhiber la survie et la réplification du micro-organisme.

Le choix de la méthode qui servira à mesurer les effets d'une nouvelle substance microbienne sur des plantes aquatiques (v. section 9) repose sur deux éléments primordiaux : 1) la possibilité que la substance atteigne des concentrations préoccupantes dans l'environnement dulcicole ou marin; 2) l'influence qu'exerceront la salinité et la température sur le devenir dans l'environnement du micro-organisme. Lors du choix de la ou des méthodes d'essai à appliquer à des invertébrés aquatiques, il faut tenir compte des caractéristiques physicochimiques de la matière d'essai (p. ex., état solide ou liquide, ou taux de suspension dans l'eau douce ou l'eau de mer) et de la répartition connue du micro-organisme dans l'eau et/ou les sédiments. Les conclusions d'études antérieures sur le devenir de la nouvelle substance microbienne une fois qu'elle pénètre dans une masse d'eau douce, d'eau d'estuaire ou d'eau de mer ou qu'elle y est mélangée, devraient aussi être prises en compte dans le choix du ou des essais sur des invertébrés aquatiques. Ces considérations devraient faciliter le choix de la ou des méthodes d'essai biologique à appliquer à des invertébrés pélagiques présents dans la colonne d'eau plutôt qu'à des invertébrés qui vivent sur ou dans les sédiments (v. section 10). Au moment de choisir la ou les méthodes d'essai biologique à appliquer à des vertébrés aquatiques (poissons), il faut tenir compte, là aussi, des caractéristiques physicochimiques de la nouvelle substance microbienne (ou du produit microbien qui y est associé), de son *expression environnementale* et de son devenir dans l'environnement<sup>54</sup> après son mélange dans l'eau douce, l'eau d'estuaire ou l'eau de mer. Dans ce cas, des poissons d'eau douce ou d'eau de mer serviront d'organismes d'essai. Des préoccupations ayant trait à une espèce qui présente un intérêt pour la pêche commerciale ou récréative et qui pourrait être touchée par la nouvelle substance microbienne peuvent influencer sur le choix de l'espèce à soumettre à des essais.

<sup>54</sup> La section 2 du présent guide traite des essais connexes portant sur l'*expression environnementale*, de même que des études sur le devenir dans l'environnement. La sous-section 4.2.6 de EC et SC (2001), intitulée « Informations relatives au devenir du micro-organisme dans l'environnement », décrit les renseignements à réunir et à déclarer sur ce sujet, conformément au *Règlement sur les RSN*.

Il existe des bases de données informatisées décrivant les effets biologiques de pathogènes microbiens connus sur diverses espèces de plantes, d'invertébrés ou de vertébrés aquatiques<sup>55</sup>. On conseille de les consulter dès le début des étapes menant au choix de la ou des méthodes d'essai et des espèces (hôtes) à utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne donnée sur des organismes aquatiques. On devrait repérer et examiner les résultats qu'elles renferment sur les micro-organismes appartenant au même genre que la nouvelle substance microbienne. Il convient d'identifier les organismes hôtes sur lesquels ces micro-organismes ont des effets nocifs et d'envisager leur utilisation dans les essais avec la nouvelle substance microbienne, à la condition qu'il existe une méthode d'essai biologique adéquate. S'il n'existe aucune espèce connue de micro-organisme pathogène appartenant au même genre que la nouvelle substance microbienne, pour laquelle les effets pathogènes et/ou toxiques sont établis et démontrables dans des essais de laboratoire, il faudrait procéder à des essais avec la nouvelle substance microbienne conformément aux méthodes recommandées (v. § 9.1.2, 9.2.2, 10.1.2, 10.1.3, 10.2.2, 10.2.3, 11.1.2 et 11.2.2) ou aux autres méthodes répertoriées (v. § 9.1.3, 9.2.3, 10.1.4, 10.2.4, 11.1.3 et 11.2.3) dans le présent guide.

#### 8.4 Essais sur des amphibiens

Dans certaines circonstances, en particulier lorsque la nouvelle substance microbienne ou sa préparation commerciale est susceptible d'avoir des effets nocifs sur les animaux aquatiques des bassins ou des étangs à faible régime hydrodynamique, il est possible d'appliquer une méthode d'essai biologique faisant appel à des espèces choisies d'amphibiens. Edginton (2001) a passé en revue les méthodes d'essai de laboratoire utilisées pour mesurer les effets de contaminants aquatiques sur des amphibiens et a

constaté l'absence de méthodes normalisées pour les anoures (c.-à-d. les grenouilles et les crapauds). Les méthodes normalisées publiées par des organismes reconnus sont restreintes à un essai de toxicité aiguë (4 à 8 jours) à renouvellement intermittent (ou à écoulement continu) sur les premiers stades larvaires de *Rana* spp. ou de *Bufo* spp. (ASTM, 2000a,b), de même qu'à un essai (version provisoire) à renouvellement intermittent de 12 jours sur des larves du crapaud africain *Xenopus laevis* (ISO, 2001). Ces méthodes comportent des lacunes, notamment la courte durée des essais et, dans le cas de ISO (2001), l'utilisation d'une espèce d'anoure que l'on ne trouve pas au Canada. Edginton (2001) a recommandé à Environnement Canada de mettre au point un essai normalisé à renouvellement intermittent sur des grenouilles élevées en laboratoire de l'espèce *Rana pipiens*, que l'on trouve dans toutes les provinces canadiennes. Parmi les trois options proposées par Edginton, on compte un essai de  $\geq 46$  jours sur les premiers stades embryonnaires et sur des têtards (larves qui se nourrissent activement) de cette espèce. Si Environnement Canada met au point et valide cet essai, ce dernier pourrait sans doute être adapté facilement et convenir à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur une espèce sensible d'amphibien répandue dans les étangs d'eau douce du Canada<sup>56</sup>. Entre temps, aucune méthode normalisée faisant appel à *R. pipiens* ou à d'autres espèces d'amphibiens n'est recommandée pour les séries d'essais de laboratoire servant à mesurer les effets écologiques nocifs de nouvelles substances microbiennes sur des organismes aquatiques ou terrestres.

#### 8.5 Essais sur des plantes terrestres

La section 12 donne des indications relatives à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des plantes terrestres. Le choix de la méthode d'essai, de même que de l'espèce de plante et du ou des modes d'exposition de celle-ci à une nouvelle substance microbienne, est fonction de différents facteurs, notamment les espèces végétales qui risquent d'être exposées lors de l'application de la matière d'essai dans l'environnement terrestre. Par exemple, pour un

<sup>55</sup> On trouvera sur les sites Web suivants des bases de données utiles sur les maladies d'organismes aquatiques : <http://fisheries.fws.gov/FHC/Handbook.htm> – ce manuel de protocoles normalisés applicables aux inspections sanitaires d'animaux aquatiques renferme des chapitres sur la bactériologie, la virologie et la parasitologie; <http://www.fao.org/DOCREP/003/X9199E/X9199E03.htm> – un chapitre de cette circulaire de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture est consacré aux pathogènes bactériens et viraux des salmonidés et des crevettes; <http://www.diplectanum.dsl.pipex.com/purls/host.htm> – cette bibliothèque virtuelle porte sur les maladies et la parasitologie des poissons, coquillages et crustacés.

<sup>56</sup> Les grenouilles et d'autres amphibiens sont reconnus pour leur sensibilité à une foule de maladies d'origine bactérienne et virale (Hird et coll., 1981; Chinchar, 2002; O-Rourke et Schultz, 2002) et à divers contaminants chimiques présents dans l'eau.

essai sur une plante agricole ou herbagère sensible, le choix d'une *monocotylédone* ou d'une *dicotylédone* pourrait se fonder sur la probabilité que l'un de ces types de plantes soit davantage exposé que l'autre au cours d'une utilisation normale de la nouvelle substance microbienne à l'étude. S'il est prévu que la probabilité sera la même dans les deux cas, il est recommandé de mener des essais sur ces deux types de plantes agricoles (v. section 12). Lorsque des arbres plutôt que des cultures agricoles, des exploitations maraîchères intensives ou des espèces de plantes herbagères risquent davantage d'être exposés à la nouvelle substance microbienne à l'étude, on utilisera des semences d'arbre comme plante hôte (v. section 12).

Lors du choix des espèces végétales à exposer à une nouvelle substance microbienne donnée, il faut tenir compte des résultats d'essais menés antérieurement en laboratoire sur des plantes terrestres exposées à cette substance ou à d'autres substances ayant des caractéristiques semblables (y compris des effets pathogènes et/ou toxiques potentiellement similaires). Tout rapport d'étude expérimentale sur le terrain avec la nouvelle substance microbienne, établi conformément au *Règlement sur les RSN* [v. § 4.2.5 dans EC et SC (2001)], devrait également être pris en compte au moment du choix de la ou des méthodes d'essai appropriées, de l'espèce d'essai (hôte) et du ou des modes d'exposition. Parmi les autres facteurs à considérer, on compte le ou les modes d'exposition de la plante hôte à la nouvelle substance microbienne (p. ex., eau d'essai, sol d'essai, lésion et vaporisation; v. section 12), le ou les stades biologiques exposés et les voies possibles de pénétration du pathogène (p. ex., graines ou semences, racines, feuilles). Pendant les essais de pathogénicité et/ou de toxicité, les conditions ambiantes doivent être rigoureusement contrôlées, car pour provoquer des maladies chez les plantes, la plupart des micro-organismes ont des besoins bien définis sur le plan de la température et de l'humidité. De même, l'éclairage, la température et la fertilité exercent une grande influence sur la capacité des plantes de manifester des symptômes de maladie. Par exemple, certains micro-organismes peuvent causer des infections latentes, celles-ci ne devenant évidentes que lorsque la plante atteint sa maturité ou devient sénescence. En outre, certaines bactéries et certains virus ne déclenchent aucun symptôme, même s'ils colonisent une plante entière.

Il existe des bases de données informatisées sur les effets biologiques de pathogènes microbiens connus sur diverses espèces de plantes terrestres<sup>57</sup>. On conseille de les consulter dès le début des étapes menant au choix de la ou des méthodes d'essai et des espèces (hôtes) à utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne donnée. On devrait repérer et examiner les résultats qu'elles renferment sur les micro-organismes appartenant au même genre que la nouvelle substance microbienne. Il convient d'identifier les plantes hôtes sur lesquelles ces micro-organismes ont des effets néfastes et d'envisager leur utilisation dans les essais avec la nouvelle substance microbienne, à la condition qu'il existe une méthode d'essai biologique adéquate. S'il n'existe aucune espèce connue de micro-organisme pathogène appartenant au même genre que la nouvelle substance microbienne, pour laquelle les effets pathogènes et/ou toxiques sont établis et démontrables dans des essais de laboratoire, il faudrait procéder à des essais avec la nouvelle substance microbienne conformément à la méthode recommandée (v. § 12.2) ou à une autre méthode répertoriée (v. § 12.3) dans le présent guide.

### 8.6 Essais sur des invertébrés terrestres

La section 13 décrit deux méthodes d'essai biologique recommandées pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur un invertébré terrestre endogé (vers de terre ou collembole). Toutefois, la série d'essais choisie à cette fin peut inclure un essai sur des abeilles domestiques ou un autre arthropode terrestre phytophile bénéfique (comme la coccinelle convergente ou la chrysope verte; v. section 13) pour lequel on dispose d'une méthode d'essai biologique reconnue et normalisée<sup>58</sup>. Ici encore, le choix de la ou

<sup>57</sup> L'Université de Bonn a mis au point un guide (*Plant Pathology Internet Guide Book*) consultable à l'adresse <http://www.pk.uni-bonn.de/ppigb/menu.htm>, qui comporte des textes d'accompagnement sur la bactériologie, la mycologie et la virologie.

<sup>58</sup> La décision d'utiliser une méthode d'essai biologique non normalisée pour laquelle il n'existe pas de protocole d'essai reconnu peut se fonder sur des préoccupations concernant l'exposition d'une espèce bénéfique particulière (p. ex., l'abeille domestique ou la coccinelle convergente), des recommandations d'organismes de réglementation quant à l'utilisation possible d'une telle espèce comme organisme d'essai, de même que l'existence de modes opératoires normalisés et défendables pour la conduite d'un tel essai par un laboratoire privé. Cette décision devrait être

des méthodes d'essai biologique à utiliser pour mesurer les effets écologiques possibles d'une nouvelle substance microbienne donnée sur des invertébrés terrestres dépend d'un certain nombre de facteurs reliés au mode le plus probable ou le plus important de pénétration de la substance en question dans l'environnement terrestre (p. ex., pulvérisation aérienne, dispersion d'une substance solide sur le sol ou la végétation, mélange dans le sol ou le sous-sol). Par exemple, si la nouvelle substance microbienne doit être vaporisée près de fleurs ou pendant la période de floraison, ou si elle risque de venir en contact avec des abeilles ou avec les pétales ou le feuillage de plantes qu'elles sont susceptibles de fréquenter, un essai mené en laboratoire sur des abeilles domestiques pourrait être indiqué<sup>59</sup>. Si la nouvelle substance microbienne est plus susceptible d'être dispersée sur ou dans le sol ou dans le sous-sol, il serait prudent d'utiliser des vers de terre (invertébrés endogés) dans la méthode d'essai biologique recommandée. Les résultats d'études antérieures menées sur le terrain ou en laboratoire constituent un autre élément à prendre en compte lors du choix de la ou des méthodes d'essai biologique à utiliser pour des invertébrés terrestres : ces études doivent avoir démontré la sensibilité relative d'abeilles domestiques, de vers de terre, de collemboles ou d'autres invertébrés terrestres à la matière d'essai ou à d'autres substances microbiennes dont le type et les effets sont semblables.

Au moment de choisir l'organisme d'essai (hôte) et la méthode qui conviennent, on devrait aussi considérer la biologie de la nouvelle substance microbienne. On pourrait se demander, par exemple, s'il existe des pathogènes connus de la même famille ou du même genre que celui ou ceux présents dans la matière d'essai et, le cas échéant, si des organismes hôtes et des méthodes d'essai ont été utilisés pour démontrer leur pathogénicité. Si des invertébrés terrestres sont réputés sensibles à des pathogènes étroitement apparentés à la substance, l'organisme d'essai devrait

---

abordée au préalable avec la DSN d'Environnement Canada au cours de la consultation avant la déclaration.

<sup>59</sup> Un tel choix serait fonction de l'existence d'un mode opératoire normalisé scientifiquement défendable, prévoyant un essai d'une durée suffisante pour que l'on puisse observer les effets pathogènes et toxiques de la substance; il dépendrait aussi des données de base disponibles sur le taux de survie habituel des abeilles faisant partie du traitement témoin négatif, données selon lesquelles la survie est suffisamment élevée (p. ex.,  $\geq 80\%$ ) pour justifier l'utilisation de ce mode opératoire.

être choisi parmi ces invertébrés. Si aucune des espèces d'organismes d'essai (hôtes) recommandées (§ 13.2) ou de remplacement (§ 13.3) indiquées dans le présent guide n'est susceptible de venir en contact avec la substance, on devrait envisager d'utiliser une autre espèce sensible appropriée (et la méthode d'essai biologique connexe, si elle existe); cette dernière devrait être apparentée le plus étroitement possible à l'un des hôtes dont on sait qu'il peut être touché par la nouvelle substance microbienne. En outre, toute altération génétique de la nouvelle substance microbienne devrait être prise en compte lors du choix de l'espèce hôte.

Il existe des bases de données informatisées sur les effets biologiques de pathogènes microbiens connus sur diverses espèces d'invertébrés terrestres<sup>60</sup>. On conseille de les consulter dès le début des étapes menant au choix de la ou des méthodes d'essai et des espèces (hôtes) à utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne donnée. On devrait repérer et examiner les résultats qu'elles renferment sur les micro-organismes appartenant au même genre que la nouvelle substance microbienne. Il convient d'identifier les invertébrés hôtes sur lesquels ces micro-organismes ont des effets néfastes et d'envisager leur utilisation dans les essais avec la nouvelle substance microbienne, à la condition qu'il existe une méthode d'essai biologique adéquate. S'il n'existe aucune espèce connue de micro-organisme pathogène appartenant au même genre que la nouvelle substance microbienne, pour laquelle les effets pathogènes et/ou toxiques sont établis et démontrables dans des essais de laboratoire, il faudrait procéder à des essais avec la nouvelle substance microbienne conformément à l'une et/ou l'autre des deux méthodes recommandées (v. § 13.2) dans le présent guide, si les effets potentiels de cette substance sur les invertébrés endogés sont préoccupants. On devrait mener des essais sur des abeilles ou des insectes foliaires (v. § 13.3.1) si de tels effets sont préoccupants pour des invertébrés phytophiles (p. ex., pollinisateurs ou insectes foliaires).

---

<sup>60</sup> Le site Web de l'Illinois Natural History Survey, à l'adresse [http://cricket.inhs.uiuc.edu/edwip\\_search.htm](http://cricket.inhs.uiuc.edu/edwip_search.htm), renferme une base de données utile sur les pathogènes des insectes. On trouvera d'autres bases de données sur les pathogènes et les espèces hôtes des insectes aux adresses suivantes : <http://sis.agr.gc.ca/brd/cc/ccctitle.html>, <http://nrri.ncaur.usda.gov/> et <http://www.atcc.org/Cultures/Products.cfm>.



### 8.7 Essais sur des vertébrés terrestres

Avant de choisir la ou les méthodes d'essai biologique qui serviront à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne donnée sur des vertébrés terrestres, il faut déterminer si l'expérience portera sur des oiseaux ou de petits mammifères. À cette fin, on tiendra compte des régions écologiques canadiennes où la nouvelle substance microbienne à l'étude risque d'entrer en contact avec des espèces fauniques, dont des oiseaux et de petits mammifères (p. ex., terres agricoles, terres forestières, milieux humides). On devrait aussi se fonder sur les conclusions d'études antérieures quant aux effets écologiques de la substance sur ces espèces, de même que sur les informations relatives aux études expérimentales sur le terrain [v. § 4.2.5 de EC et SC (2001)] mettant en lumière la sensibilité relative des petits mammifères et des oiseaux à la matière d'essai. La nature de la nouvelle substance microbienne (p. ex., poudre, suspension, vapeur), sa granulométrie s'il s'agit d'un solide, de même que le mode de dispersion dans l'environnement (p. ex., pulvérisation aérienne, épandage sur le sol, mélange dans le sol ou le sous-sol), devraient être pris en compte dans l'évaluation de la probabilité que des oiseaux ou de petits mammifères soient exposés à la substance.

La série 885 de l'USEPA recommande d'utiliser, dans les essais de laboratoire visant à mesurer les effets de pesticides microbiens sur des oiseaux, le canard colvert (*Anas platyrhynchos*) ou le colin de Virginie (*Colinus virginianus*) (USEPA, 1996b,k,l,m). Si le mode prévu d'application de la substance au Canada fait en sorte que le risque d'exposition est plus élevé pour les oiseaux herbivores fréquentant les prairies, on utilisera le colin de Virginie plutôt que le canard colvert pour les essais de pathogénicité et/ou de toxicité de 30 jours. Par contre, si le risque est plus élevé pour le canard colvert (une espèce migratrice principalement insectivore, qui fréquente les milieux humides), c'est cette espèce que l'on utilisera pour les essais sur des vertébrés terrestres. Le fait que le canard colvert soit répandu partout au Canada — contrairement au colin de Virginie, que l'on trouve principalement dans les États du Midwest et ceux de l'est des États-Unis, de même que dans le sud de l'Ontario — justifie l'utilisation de cette espèce avienne comme organisme d'essai lorsque des habitats différents et les modes d'utilisation et de dispersion d'une

nouvelle substance microbienne ne sont pas des facteurs primordiaux.

L'USEPA (1996o,q,t,u) indique que des souris ou des rats sont à privilégier dans les essais de la série 885 menés en laboratoire sur de petits mammifères auxquels on administre un pesticide microbien par voie orale ou par inhalation. Conformément à cette recommandation et aux directives que renferment les méthodes d'essai biologique de l'USEPA servant à mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité d'une nouvelle substance microbienne pour de petits mammifères, on utilisera des souris ou des rats pour évaluer les effets d'une matière d'essai sur de petits mammifères (v. section 14). Si une autre espèce est utilisée (p. ex., gerbille, cobaye ou lapin), il faudrait justifier ce choix auprès de représentants d'Environnement Canada et/ou de Santé Canada au cours de la consultation avant la déclaration (v. § 1.1.6) et inclure cette justification dans le rapport sur les essais. Lorsque l'exposition à une substance microbienne dans le milieu naturel soulève des préoccupations particulières pour une espèce de mammifère sauvage qui n'est pas considérée comme en péril<sup>61</sup>, on pourrait prélever des spécimens de cette espèce dans la nature et, après leur acclimatation aux conditions de laboratoire, les soumettre à des essais sur les effets d'une nouvelle substance microbienne à l'aide de la méthode recommandée à la section 14.

Comme dans le cas des essais de pathogénicité et/ou de toxicité menés sur d'autres espèces hôtes, on devrait consulter les bases de données informatisées décrivant les effets biologiques de pathogènes microbiens connus sur différentes espèces d'oiseaux ou de petits mammifères<sup>62</sup>, et ce, dès le début des

<sup>61</sup> On trouvera sur le site Web (<http://www.cosewic.gc.ca>) du Comité sur la situation des espèces en péril au Canada, mis sur pied par le gouvernement canadien, la liste des espèces sauvages considérées comme « en péril » au Canada. Un sommaire par groupe taxinomique des espèces désignées en péril (disparues, disparues du pays, en voie de disparition, menacées et préoccupantes) est disponible à l'adresse [http://www.cosewic.gc.ca/htmlDocuments/FullListSpecies\\_f.htm](http://www.cosewic.gc.ca/htmlDocuments/FullListSpecies_f.htm).

<sup>62</sup> On peut communiquer avec l'American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians afin d'avoir accès, par le biais de son site Web (<http://www.aavld.org>), à une base de données exhaustives sur les pathogènes d'oiseaux et de mammifères, moyennant des droits d'adhésion. Des informations générales sur les maladies des animaux sont disponibles à l'adresse <http://netvet.wustl.edu>. Un autre site utile sur la pathologie systémique, à l'adresse <http://vetpath4.afip.org/systemic/index.php>, est réservé aux

étapes menant au choix de la ou des méthodes d'essai et des vertébrés terrestres qui serviront d'espèces hôtes.

### **8.8 Questionnaire**

En 2002, la division des pesticides microbiens, qui fait partie de la direction des biopesticides et de la prévention de la pollution de l'USEPA (bureau de Washington, DC), a été invitée à remplir un questionnaire non officiel sur le nombre approximatif d'essais de laboratoire effectués jusqu'à cette date, à l'aide d'AAM ou de leur PC, sur diverses catégories d'organismes d'essai (hôtes) (p. ex., plantes, invertébrés et vertébrés aquatiques ou terrestres). Elle

a également été priée de fournir des renseignements supplémentaires sur le nombre d'essais ayant mis en lumière les effets pathogènes et/ou toxiques de ces substances et sur l'utilisation de divers types de témoins, notamment. Le questionnaire a aussi été envoyé à trois laboratoires privés des États-Unis ayant de l'expérience dans les essais visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'AAM ou de PC sur divers organismes hôtes dans des conditions de laboratoire contrôlées. Certains des résultats compilés à partir de ce questionnaire sont résumés dans les six sections qui suivent, sous le titre « Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens ».

## Essais sur des plantes aquatiques

### 9.1 Plantes dulcicoles

#### Repères

- L'essai biologique normalisé que l'on recommande d'utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne sur une plante dulcicole consiste en un essai de 7 jours sur la croissance du macrophyte dulcicole *Lemna minor*. Cet essai, adapté de EC (1999a), permet de mesurer la toxicité sub létale d'une substance ou d'une matière en regard de cet organisme d'essai.
- Cette méthode d'essai biologique doit être appliquée sous forme d'essai à renouvellement intermittent. L'espèce est exposée à la matière d'essai mélangée à de l'eau douce préparée en laboratoire.
- Cet essai de 7 jours risque d'être trop bref pour permettre de détecter les effets pathogènes de certains micro-organismes. Il n'est pas recommandé de le prolonger (p. ex., jusqu'à 14 jours) sans procéder à d'autres travaux de recherche et, au besoin, sans modifier le critère de validité de l'essai inhérent à la méthode d'essai.
- L'OCDE (2002b) a élaboré des lignes directrices provisoires relatives à un essai d'inhibition de la croissance de *L. minor* ou de *L. gibba* sur 7 jours, essai qui ressemble à celui décrit dans EC (1999a) et qui peut servir de méthode de remplacement. D'autres méthodes d'essai biologique servant à mesurer les effets nocifs de nouvelles substances microbiennes sur des plantes dulcicoles ne sont pas disponibles ou n'ont pas été éprouvées aux fins de la mise en application des règlements.

#### 9.1.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens

Douville (2001) a passé en revue les études de recherche sur les effets pathogènes et/ou toxiques de micro-organismes ou de produits microbiens donnés sur diverses espèces de plantes aquatiques dans des conditions de laboratoire contrôlées. Les rapports de ces études renferment peu de détails. Quelques travaux sur la mesure de la croissance du macrophyte dulcicole *Lemna minor* exposé à des espèces particulières de bactéries ou de champignons sont signalés. Douville (2001) cite également des études faisant état des effets pathogènes de certaines espèces de champignons sur la myriophylle à épi

(*Myriophyllum spicatum*). Il a relevé une seule étude où sont décrits des essais visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de micro-organismes ou de produits microbiens sur des algues ou des diatomées.

Les réponses au questionnaire non officiel envoyé à la division des biopesticides de l'USEPA et à trois laboratoires privés des États-Unis à l'été 2002 (v. § 8.8) révèlent que les données disponibles sur les plantes dulcicoles exposées à des AAM ou à leur PC sont tirées d'un petit nombre d'essais (neuf au total). Cinq de ces essais ont porté sur des pesticides bactériens et quatre sur des pesticides fongiques. Une lenticule (*Lemna* sp.), une algue dulcicole (*Selenastrum capricornutum*) et une diatomée dulcicole ont servi de plantes hôtes. La plupart de ces essais ont mis en lumière des effets positifs (c.-à-d. pathogènes et/ou toxiques).

#### 9.1.2 Méthode d'essai biologique recommandée

Dans ses lignes directrices de la série 885 sur les pesticides microbiens, l'USEPA (1996c) décrit les méthodes d'essai et les espèces qui conviennent à l'étude des effets pathogènes et/ou toxiques de micro-organismes sur des plantes non visées. Dans le cas des pesticides microbiens destinés à des usages en eau douce ou susceptibles de se répandre et de survivre dans des écosystèmes dulcicoles, il est indiqué que des plantes aquatiques, dont *L. gibba* (lenticule bossue), *S. capricornutum* (une algue verte dulcicole) et une diatomée dulcicole, peuvent servir d'organismes d'essai. Toutefois, aucune méthode d'essai biologique applicable à des essais portant spécifiquement sur ces espèces n'est décrite dans USEPA (1996c) ni dans aucune des lignes directrices de la série 885. En outre, on n'a relevé aucun mode opératoire normalisé utilisé par des laboratoires gouvernementaux ou privés pour les essais de pathogénicité et/ou de toxicité de micro-organismes ou de nouvelles substances microbiennes pour les plantes dulcicoles.

Dans les directives de EC et SC (2001) relatives aux données à déclarer sur les effets écologiques d'une nouvelle substance microbienne, il est indiqué que la lenticule (*Lemna* sp.) peut servir d'organisme d'essai. En 1999, Environnement Canada a publié une méthode d'essai biologique servant à mesurer

l'inhibition de la croissance du macrophyte dulcicole *L. minor* exposé à des produits chimiques toxiques ou à d'autres substances d'essai (EC, 1999a). On a communément recours, en Amérique du Nord et ailleurs dans le monde, à des essais d'inhibition de la croissance des lenticules pour déterminer les effets toxiques de substances d'essai sur des plantes dulcicoles (USEPA, 1996gg; ASTM, 2000c; OCDE, 2002b). Au Canada, *L. minor* est l'une des lenticules les plus communes et les plus répandues; elle croît dans les eaux douces dormantes ou à faible circulation (bassins, marécages et lacs, cours d'eau calmes) de la plupart des provinces et territoires. Les lenticules possèdent de nombreuses qualités convenant aux essais de toxicité menés en laboratoire, dont une petite taille, une structure relativement simple, une croissance rapide et une sensibilité aux contaminants aquatiques, sans compter qu'elles sont faciles à cultiver. Contrairement aux essais sur les algues, ceux sur les lenticules prévoient le renouvellement des concentrations expérimentales et permettent d'expérimenter des concentrations colorées ou troubles (EC, 1999a). En raison de ces caractéristiques, *L. minor* se prête très bien aux essais d'inhibition de la croissance en vue de mesurer les effets écologiques néfastes de nouvelles substances microbiennes sur des plantes aquatiques.

Il est recommandé d'utiliser une version modifiée de l'essai d'inhibition de la croissance de la lenticule mineure, mis au point par Environnement Canada (EC, 1999a), en tant que méthode d'essai biologique à appliquer pour l'étude des effets écologiques néfastes de nouvelles substances microbiennes sur des plantes dulcicoles. Le tableau 1 présente un résumé de cette méthode modifiée, de même que d'autres spécifications pertinentes. Pendant l'expérience, chaque concentration expérimentale (y compris les solutions ou suspensions témoins) doit être renouvelée au moins deux fois au cours de l'essai de 7 jours, ou plus souvent (p. ex., tous les jours) si la ou les concentrations microbiennes de la matière d'essai sont particulièrement instables dans l'eau douce. Comme c'est le cas pour d'autres méthodes d'essai avec de nouvelles substances microbiennes, chaque essai sur *L. minor* doit inclure un témoin négatif (v. § 4.1). Conformément à EC (1999a), il faut utiliser un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif) dans le cadre de l'essai (ou parallèlement à celui-ci). Il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux (§ 4.4), tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile (§ 4.5) est

facultatif. La mesure de l'infectivité, effectuée au terme de l'essai sur des homogénats de plantes entières de chaque traitement, est également facultative et dépend des objectifs de l'étude (v. section 5). Les spécifications propres aux essais à concentration unique (§ 3.3.1) ou à concentrations multiples (§3.3.2) sur *L. minor* sont résumées au tableau 1. La matière d'essai mélangée à l'eau est le mode d'exposition de cette espèce dulcicole.

La croissance de la plante au terme de l'essai constitue le paramètre biologique à évaluer; cette croissance est déterminée d'après le nombre de *thalles* dans chaque enceinte expérimentale et d'après la masse sèche obtenue. Dans le cas d'un essai à concentration unique (c.-à-d. à la CDM de la matière d'essai), les paramètres statistiques mesurés à la fin de l'essai sont le nombre moyen ( $\pm$  ET) de thalles de chaque traitement (y compris des témoins) et la masse sèche moyenne ( $\pm$  ET) des thalles de chaque traitement. Les valeurs des paramètres de croissance établies pour la CDM et pour les traitements témoins négatifs sont comparées statistiquement à l'aide du *test de Student* ou d'une autre méthode de comparaison par paire (EC, 2004d); on procède de la même façon pour comparer les valeurs de chacun des témoins (autres que le négatif) inclus dans l'essai et celles du traitement témoin négatif. Si l'on procède à un essai à concentrations multiples, il faut établir les mêmes valeurs statistiques pour chaque traitement. Lorsque les données le permettent, il faut aussi calculer la  $CI_{25}$  7 jours (c.-à-d. le nombre de thalles obtenues et leur masse sèche, pour chaque traitement), de même que ses limites de confiance de 95 % (EC, 2004d). Toujours si les données le permettent, la CSEO et la CMEO en regard du nombre de thalles obtenues et leur masse sèche doivent être établies (EC, 2004d). Si l'essai à concentrations multiples comporte un ou plusieurs témoins autres que le négatif, on procédera à des comparaisons par paire des paramètres statistiques établis pour ce ou ces traitements et pour le traitement témoin négatif, selon la procédure décrite ci-dessus. Il convient de se conformer aux indications du guide des essais d'écotoxicité d'Environnement Canada (EC, 2004d) lors de l'établissement des calculs et des comparaisons.

### 9.1.3 Autres méthodes ou procédures

Étant donné que l'infectivité d'une nouvelle substance microbienne donnée peut prendre diverses formes et présenter un taux variable, et compte tenu du temps qui peut s'écouler avant que la pathogénicité de cette substance inhibe la croissance de *L. minor*, un essai de 7 jours sur cette espèce végétale dulcicole peut être trop court pour que l'on puisse détecter un effet inhibiteur. Pour compenser cette éventuelle faiblesse, il semble logique de prolonger l'essai au-delà de 7 jours. Cependant, une telle modification ne devrait pas être appliquée à moins de modifier également — si une telle procédure est applicable — le critère de validité de l'essai (tableau 1) élaboré pour cette méthode d'essai (EC, 1999a).

Il semble prudent d'attendre qu'Environnement Canada procède à d'autres évaluations et qu'une validation interlaboratoire soit effectuée avant d'envisager de prolonger l'essai (et avant d'obtenir une approbation à cette fin) en vue d'accroître la probabilité que la méthode d'essai biologique recommandée ici (v. § 9.1.2) permette de détecter l'inhibition de la croissance de plantes dulcicoles occasionnée par divers types de micro-organismes pathogènes. Comme il paraît souhaitable de porter l'essai à 14 jours ou plus, il est recommandé de discuter de cette prolongation avec des représentants d'Environnement Canada et/ou de Santé Canada au cours de la consultation avant la déclaration (v. §1.1.6), tout en gardant à l'esprit la modification qu'il faudrait apporter au critère de validité de l'essai mentionné au tableau 1. Avec le temps, une utilisation accrue de cette méthode d'essai biologique pour divers types de micro-organismes pathogènes aidera également Environnement Canada à déterminer s'il est justifié de procéder à une telle modification (ou d'utiliser une autre méthode d'essai pour mesurer les effets sur des plantes dulcicoles). Comme il a été prouvé que la méthode d'essai permettait de détecter des effets toxiques en moins de 7 jours, il est évident que l'essai peut servir à mesurer, sur *L. minor*, les effets sublétaux des métabolites toxiques d'une nouvelle substance microbienne et/ou ceux associés à tout produit chimique entrant dans la préparation de la matière d'essai.

L'OCDE (2002b) a élaboré des lignes directrices provisoires relatives à un essai d'inhibition de la croissance de *L. minor* ou de *L. gibba* sur 7 jours. Les procédures et conditions d'essai décrites dans ces

lignes directrices sont semblables à celles de la méthode d'essai sur des lenticules mineures publiée par Environnement Canada (1999a), méthode que l'on recommande d'utiliser pour les essais sur des plantes dulcicoles (v. § 9.1.2). Un essai d'inhibition de la croissance de la lenticule mineure exécuté conformément à OCDE (2002b) pourrait constituer une solution de rechange acceptable à la méthode d'essai décrite dans EC (1999a). Dans un tel cas, les observations du paragraphe précédent concernant la prolongation de la durée de l'essai s'appliquent également.

Les lignes directrices provisoires de l'USEPA (1996gg) relatives à l'essai de toxicité faisant appel à *Lemna* spp. présentent des similarités avec EC (1996a), mais il n'est pas recommandé de l'utiliser pour un essai sur *L. minor*. La méthode de l'USEPA a pour désavantage de ne pas inclure de critère de validité de l'essai fondé sur la croissance des thalles du groupe témoin négatif. En outre, le paramètre statistique «  $CE_x$  » (p. ex.,  $CE_{50}$ ) associé à un essai à concentrations multiples est incorrect, car il est utilisé pour recueillir des données sur des *effets quantiques*, alors que la croissance mesurée au cours d'un tel essai devrait être exprimée à l'aide d'un paramètre *quantitatif* (p. ex.,  $CI_{25}$ ).

L'American Society for Testing and Materials (ASTM) a publié un guide des essais de toxicité *sans renouvellement* sur *L. gibba* (ASTM, 2000c). Une fois modifié, cet essai de 7 jours sur l'inhibition de la croissance de cette lenticule pourrait servir à mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité de nouvelles substances microbiennes conformément à la méthode recommandée pour les essais sur *L. minor* (v. tableau 1).

L'ASTM a aussi publié un guide des essais de toxicité à renouvellement intermittent sur des macrophytes dulcicoles émergents qui croissent dans les sédiments (ASTM, 2000d). Ce guide recommande d'utiliser le riz domestique (*Oryza sativa*) comme organisme d'essai. L'espèce de plante dulcicole choisie est exposée à diverses concentrations d'une substance d'essai dissoute dans une solution nutritive dans laquelle les plantes sont placées (dans des pots renfermant un sédiment témoin négatif). Après deux semaines d'exposition, il faut établir, en tant que mesure de croissance des plantes, la teneur en chlorophylle d'extraits de matière foliaire de chaque traitement. Il n'est pas recommandé d'utiliser cette

**Tableau 1 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 7 jours sur le macrophyte dulcicole *Lemna minor***

**Essai universel**

Méthode d'essai	— Conforme à EC (1999a), <i>Méthode d'essai biologique : essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole, Lemna minor.</i>
Type d'essai	— Renouvellement intermittent de chaque concentration expérimentale (y compris les témoins) pendant 7 jours; renouvellement de chaque concentration expérimentale (y compris chaque solution ou suspension témoin) au moins deux fois, soit les jours 3 et 5 de l'essai.
Organisme d'essai	— <i>L. minor</i> provenant d'une culture de 7–10 jours, chaque plante comptant 3 thalles.
Acclimatation	— Spécimens acclimatés pendant 18–24 h au moins à l'eau témoin/de dilution.
Nombre de plantes par enceinte expérimentale	— 2
Volume par enceinte expérimentale	— 100–150 mL, dans un bécher ou une autre enceinte expérimentale appropriée de 150 mL.
Eau témoin/de dilution	— Milieu de croissance SIS (norme suédoise) [v. § 5.3 dans EC (1999a)]; teneur en OD de 90–100 % de la valeur de saturation lorsque l'eau est versée dans les enceintes expérimentales.
Température de l'eau	— Température moyenne journalière de $25 \pm 2$ °C tout au long de l'essai.
Éclairage	— En spectre continu ininterrompu.
pH	— Aucun rajustement si le pH de la ou des concentrations expérimentales se situe entre 6,5 et 9,5; deuxième essai recommandé (pH rajusté) si le pH d'un traitement se situe en dehors de cette plage.
Aération	— Aucune aération pendant l'essai.
Témoins	— Chaque essai doit comporter un témoin négatif; il faut déterminer la sensibilité des organismes d'essai à un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Mode d'exposition	— Matière d'essai mélangée à l'eau témoin/de dilution.
CDM pour l'eau	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/mL d'eau, ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aqueux (v. § 3.3.1.1).
Essai d'infectivité	— Facultatif – la décision à cet égard se fonde sur la teneur mesurée en nouvelle substance microbienne d'homogénats de <i>L. minor</i> entières de chaque traitement, au cours et/ou au terme de l'essai.
Mesures	— Mesure journalière de la température dans des enceintes expérimentales représentatives; mesure du pH au début et à la fin de l'essai, de même qu'avant et après chaque renouvellement, dans une ou plus d'une répétition de chaque traitement, y compris le ou les témoins; mesure de l'intensité lumineuse une fois au cours de l'essai, en plusieurs points de la surface du milieu d'essai; si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai ainsi qu'au début et à la fin d'au moins un cycle de renouvellement.

Observations	— Nombre de thalles et aspect des plantes au début et à la fin de l'essai; masse sèche au terme de l'essai; dénombrement facultatif des thalles en deux autres occasions au cours de l'essai, pour calculer la vitesse de croissance.
Paramètres biologiques	— Croissance, d'après l'augmentation du nombre de thalles au cours de l'essai et d'après la masse sèche au terme de l'essai.
Validité de l'essai	— Essai invalide si le nombre de thalles du témoin négatif n'est pas au moins 8 fois plus élevé à la fin de l'essai de 7 jours (en d'autres termes, le nombre moyen de thalles du témoin négatif doit être de $\geq 48$ à la fin de l'essai pour que celui-ci soit valide).

### ***Essai à concentration unique***

Nombre de traitements	— Au moins deux (CDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	— Au moins trois par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre de plantes par traitement	— Au moins six (deux par répétition; trois répétitions par traitement).
Mode d'exposition	— Matière d'essai à sa CDM mélangée à l'eau douce (c.-à-d. témoin SIS/eau de dilution).
Paramètres statistiques	— Nombre moyen ( $\pm$ ET) de thalles de chaque traitement à la fin de l'essai; masse sèche moyenne ( $\pm$ ET) des thalles de chaque traitement à la fin de l'essai.
Comparaisons statistiques	— CDM et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le nombre moyen de thalles et dans la masse sèche moyenne des thalles à la fin de l'essai; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

Nombre de concentrations (ou nombre de traitements)	— Au moins cinq, dont la CDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé d'utiliser sept concentrations plus un témoin négatif, de même qu'un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	— Au moins trois par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin; il doit y en avoir quatre par traitement pour la détermination de la CSEO/CMEO.
Nombre de plantes par traitement	— Au moins six (deux par répétition; trois répétitions par traitement).
Mode d'exposition	— Matière d'essai à sa CDM et à des concentrations plus faibles, mélangée à l'eau douce (c.-à-d. témoin SIS/eau de dilution).
Paramètres statistiques	— Nombre moyen ( $\pm$ ET) de thalles de chaque traitement à la fin de l'essai; masse sèche moyenne ( $\pm$ ET) des thalles de chaque traitement à la fin de l'essai; si les données le permettent, $CI_{25}$ 7 jours pour la masse sèche des thalles, CSEO/CMEO pour le nombre de thalles obtenues et la masse sèche des thalles.
Comparaisons statistiques	— Concentrations expérimentales et témoin négatif, pour détecter toute baisse significative du nombre moyen de thalles et de la masse sèche moyenne des thalles à la fin de l'essai; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

---

méthode d'essai pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité de nouvelles substances microbiennes pour des plantes dulcicoles, car rien ne prouve que les phytopathogènes abaissent la teneur en chlorophylle de cet organisme d'essai, sans compter qu'il s'agit d'une mesure indirecte de la croissance des plantes, sans autre paramètre indicatif de la pathogénicité de la matière d'essai.

Environnement Canada a publié une méthode d'essai biologique pour la mesure de la toxicité sublétale de substances d'essai pour l'algue d'eau douce *S. capricornutum* (1992b); l'inhibition de la croissance constitue aussi le paramètre biologique de cette méthode. Il n'est pas recommandé d'utiliser cette méthode, ni celle décrite dans USEPA (2002a; v. section 14 de ce document) pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité de nouvelles substances microbiennes pour des espèces choisies de plantes dulcicoles. De fait, ces méthodes d'essai sont considérées comme inacceptables aux fins présentes. Dans chaque cas, il n'y a aucun renouvellement des concentrations expérimentales et la durée des essais est très courte [72 h dans EC (1992b); 96 h dans USEPA (2002a)]. De plus, ces méthodes d'essai ne se prêtent pas à la mesure de l'infectivité en raison de la quantité relativement réduite de tissus provenant d'essais sur des algues unicellulaires. Autre inconvénient, il n'est pas possible de mesurer l'inhibition de la croissance de *S. capricornutum* si les suspensions d'essai sont brouillées, ce qui est souvent le cas des suspensions microbiennes à la CDM et à certaines concentrations plus faibles.

L'essai servant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des plantes dulcicoles (§ 9.1.2) doit se dérouler à des températures de  $25 \pm 2$  °C. Ces températures conviennent à la plupart des micro-organismes mésophiles, mais elles sont trop élevées pour les micro-organismes psychrophiles. À l'heure actuelle, aucune méthode d'essai biologique normalisée ne convient à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques d'un micro-organisme psychrophile sur une espèce de plante dulcicole. On devrait encourager la recherche menant à la mise au point d'une telle méthode.

## 9.2 Plantes estuariennes ou marines

### Repères

- *L'essai biologique normalisé que l'on recommande d'utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur la survie et le succès de reproduction d'une plante marine consiste en un essai de 9 jours sur la macroalgue rouge *Champia parvula*.*
- *Cet essai a été adapté d'une méthode publiée par l'USEPA; il s'agit d'une procédure rapide pour mesurer la toxicité chronique d'échantillons d'effluents ou d'eaux réceptrices pour cet organisme d'essai. Les paramètres ultimes sont la survie des plantes femelles après 9 jours, le nombre de cystocarpes produits par reproduction sexuée dans chaque traitement, de même que l'aspect des plantes qui ont survécu, y compris la présence de lésions, de tissu nécrotique ou d'anomalies du développement des cystocarpes.*
- *Cette méthode d'essai biologique prévoit une exposition de 48 h à chaque traitement (y compris les témoins), avec renouvellement intermittent des concentrations expérimentales après 24 h, suivie du transfert des plantes femelles dans de l'eau de mer non contaminée et d'une période d'observation des effets post-exposition pendant 7 jours. L'espèce est exposée à la matière d'essai mélangée à de l'eau de mer dont la salinité est rajustée à  $30 \pm 2$  ‰.*
- *Cet essai de 9 jours risque d'être trop bref pour permettre de détecter les effets pathogènes de certains micro-organismes. Il n'est pas recommandé de le prolonger sans procéder à d'autres travaux de recherche et, au besoin, sans modifier le critère de validité de l'essai inhérent à la méthode d'essai. D'autres méthodes d'essai biologique servant à mesurer les effets nocifs de nouvelles substances microbiennes sur des plantes estuariennes ou marines ne sont pas disponibles ou n'ont pas été éprouvées aux fins de la mise en application des règlements.*

### 9.2.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens

Douville (2001) a passé en revue les études de recherche sur les effets pathogènes et/ou toxiques de micro-organismes ou de produits microbiens donnés sur diverses espèces de plantes aquatiques dans des conditions de laboratoire contrôlées. Dans la plupart des études qu'il cite, des plantes dulcicoles servent d'organismes d'essai (hôtes); une seule étude (Kerwin et coll., 1988) porte sur les effets d'un micro-



organisme sur une espèce de plante estuarienne ou marine.

Les réponses au questionnaire non officiel envoyé à la division des biopesticides de l'USEPA et à trois laboratoires privés des États-Unis à l'été 2002 (v. § 8.8) révèlent qu'aucun laboratoire n'a signalé avoir procédé à des essais au cours desquels des plantes estuariennes ou marines ont été exposées à des AAM ou à leur PC.

### 9.2.2 Méthode d'essai biologique recommandée

Il existe peu de directives réglementaires sur les espèces végétales et les méthodes convenant à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques de micro-organismes ou de nouvelles substances microbiennes sur des plantes estuariennes ou marines. Des lignes directrices de la série 885 de l'USEPA sur les pesticides microbiens portent sur les essais de détection des effets de ces pesticides sur des plantes non visées (USEPA, 1996c). À l'exception d'une mention quant à l'utilisation possible de la diatomée marine *Skeletonema costatum*, aucune indication n'est donnée dans USEPA (1996c) ni dans aucune des lignes directrices de la série 885 pour ce qui est des méthodes d'essai convenant à des plantes estuariennes ou marines. On ne trouve aucune mention non plus dans EC et SC (2001) quant aux espèces candidates (ou aux méthodes d'essai) à utiliser pour mesurer les effets de nouvelles substances microbiennes sur des plantes marines ou estuariennes. L'ARLA (2001) précise que des essais sur des plantes marines sont exigés pour évaluer les AAM si le profil d'emploi de ces derniers risque d'entraîner une exposition des plantes marines, mais aucune autre indication n'est donnée.

Il est recommandé d'utiliser une version modifiée de l'essai de l'USEPA sur la reproduction sexuée de la macroalgue rouge *Champia parvula* [section 16 de USEPA (2002b)] pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des plantes marines. Cette méthode d'essai est maintenant couramment utilisée pour mesurer à court terme la *toxicité chronique* d'échantillons d'effluents ou d'eaux réceptrices pour des plantes marines dans des conditions de laboratoire contrôlées. Au Canada, cet essai est exigé dans le cadre des Programmes d'études de suivi des effets sur l'environnement, lesquels visent les établissements du secteur des pâtes et papiers et de celui de l'exploitation minière qui rejettent leurs effluents dans les eaux côtières

(Scroggins et coll., 2002a,b). L'ASTM (2000e) a aussi publié un guide des essais sur la reproduction sexuée d'algues marines. Ce guide inclut, pour *C. parvula*, des procédures et conditions semblables à celles définies dans USEPA (2002b). Il est indiqué dans ce guide que la méthode d'essai peut servir à la mesure des effets de produits chimiques individuels.

Le tableau 2 présente les modifications et les spécifications de la méthode d'essai [adaptée de USEPA (2002b)] applicable à des nouvelles substances microbiennes. La méthode d'essai modifiée fait appel à des branches mâles et femelles de la plante marine *C. parvula* ayant atteint la maturité sexuelle, de même qu'à des groupes témoins. Les branches sont exposées pendant 48 h à des répétitions de la CDM (et de concentrations plus faibles dans le cas d'un essai à concentrations multiples). Cette exposition est suivie d'une période de rétablissement de 7 jours dans de l'eau de mer, période qui permet d'observer la formation de cystocarpes par suite de la fécondation survenue pendant l'exposition. Il faut renouveler chaque concentration expérimentale (y compris les témoins) 24 h après le début de l'exposition. Les paramètres biologiques associés à cet essai sont le pourcentage de survie des plantes femelles et, à titre de mesure du succès de reproduction, le nombre de cystocarpes par plante femelle. On doit aussi observer la présence de tissu nécrotique et les indices de changements morphologiques (ASTM, 2000e).

Comme c'est le cas pour d'autres méthodes d'essai avec de nouvelles substances microbiennes, chaque essai sur *C. parvula* doit inclure un témoin négatif (v. § 4.1). Conformément à USEPA (2002b), il faut utiliser un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif) dans le cadre de l'essai (ou parallèlement à celui-ci). Il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux (§ 4.4), tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile (§ 4.5) est facultatif. La mesure de l'infectivité, effectuée au terme de l'essai sur des homogénats de plantes entières de chaque traitement, est également facultative et dépend des objectifs de l'étude (v. section 5). Les spécifications propres aux essais à concentration unique (§ 3.3.1) ou à concentrations multiples (§3.3.2) sur *C. parvula* sont résumées au tableau 2. La matière d'essai mélangée à l'eau de mer constitue le mode d'exposition de cette espèce marine.

**Tableau 2 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 9 jours sur la macroalgue rouge *Champia parvula***

**Essai universel**

Méthode d'essai	— Conforme à la section 16 de USEPA (2002b), <i>Test Method — Red Macroalga, Champia parvula, Sexual Reproduction Test Method 1009.0.</i>
Type d'essai	— Exposition de 48 h à chaque concentration expérimentale (y compris les témoins), avec renouvellement intermittent de chaque concentration après 24 h d'exposition; transfert des plantes dans l'eau témoin/de dilution après 48 h pour une période de rétablissement de 7 jours.
Organisme d'essai	— Macroalgue rouge <i>C. parvula</i> .
Acclimatation	— Cultures algales mères monospécifiques de plantes mâles et femelles, maintenues dans des flacons Erlenmeyer de 1000 mL distincts renfermant un milieu de culture aéré.
Volume par enceinte expérimentale	— $\geq 100$ mL, dans un verre en polystyrène de 200 mL ou un flacon Erlenmeyer de 250 mL.
Plantes par enceinte expérimentale	— Cinq plantes femelles pourvues de pointes de branches de 7–10 mm de longueur; une plante mâle pourvue d'une branche de 2–3 cm de longueur.
Eau témoin/de dilution	— Eau de mer naturelle dont la salinité est de 30 ‰, ou mélange moitié-moitié, environ, d'eau de mer naturelle et d'eau de mer artificielle dont la salinité est rajustée à 30 ‰; teneur en OD de 90–100 % de la valeur de saturation lorsque l'eau est versée dans les enceintes expérimentales.
Salinité	— $30 \pm 2$ ‰
Température de l'eau	— Température moyenne journalière de $23 \pm 1$ °C tout au long de l'essai.
Éclairage	— En spectre continu (p. ex., ampoules fluorescentes à lumière blanche et crue); photopériode : 16 h d'éclairage et 8 h d'obscurité.
pH	— Aucun rajustement si le pH de la ou des concentrations expérimentales se situe entre 7,0 et 8,5; deuxième essai recommandé (pH rajusté) si le pH d'un traitement se situe en dehors de cette plage.
Aération	— Modérée dans chaque enceinte expérimentale tout au long de l'essai; la teneur en OD ne doit pas être inférieure à 4,0 mg/L.
Témoins	— Chaque essai doit comporter un témoin négatif; il faut déterminer la sensibilité des organismes d'essai à un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Mode d'exposition	— Matière d'essai mélangée à l'eau témoin/de dilution.
CDM pour l'eau	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/mL d'eau, ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aqueux (v. § 3.3.1.1).
Essai d'infectivité	— Facultatif – la décision à cet égard se fonde sur la teneur mesurée en nouvelle substance microbienne d'homogénats de <i>C. parvula</i> entières de chaque traitement, au cours et/ou au terme de l'essai.
Mesures	— Au cours des 48 premières heures : mesure de la température, du pH, de l'OD et de la salinité dans une répétition de chaque traitement et dans les suspensions ou solutions fraîches et âgées; mesures quotidiennes dans des enceintes expérimentales représentatives; mesures quotidiennes par la suite jusqu'à la fin de l'essai; si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de chaque période de renouvellement pendant les 48 premières heures de l'essai.

- Observations — Observations quotidiennes, dans chaque enceinte expérimentale, de l'aspect des solutions ou suspensions d'essai, des taux d'aération et de l'état physique des plantes; aspect de chaque plante et nombre de cystocarpes par plante femelle à la fin de l'essai, dans chaque enceinte expérimentale; signes de tissu nécrotique et/ou de changements morphologiques.
- Paramètres biologiques — Survie et aspect (y compris des lésions ou un développement anormal des cystocarpes) des plantes femelles et nombre de cystocarpes par plante.
- Validité de l'essai — Essai invalide si le pourcentage de survie est de <80 % ou si le nombre moyen de cystocarpes dans le groupe témoin négatif est de <10/plante.

### ***Essai à concentration unique***

- Nombre de traitements — Au moins deux (CDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
- Nombre de répétitions — Quatre par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
- Nombre de plantes par traitement — Vingt pointes de branches de plantes femelles et quatre plantes mâles.
- Mode d'exposition — Matière d'essai à sa CDM mélangée à l'eau de mer dont la salinité est de  $30 \pm 2$  ‰.
- Paramètres statistiques — Pourcentage de survie des pointes de branches des plantes femelles de chaque traitement à la fin de l'essai; nombre moyen ( $\pm$  ET) de cystocarpes par plante de chaque traitement à la fin de l'essai; pourcentage de plantes de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement présentant un aspect atypique, y compris des lésions et des cystocarpes dont le développement est anormal au terme de l'essai.
- Comparaisons statistiques — CDM et témoin négatif à la fin de l'essai, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie des plantes femelles, dans le nombre moyen de cystocarpes par plante à la fin de l'essai et dans le pourcentage de plantes femelles présentant un aspect atypique; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

- Nombre de concentrations (ou nombre de traitements) — Au moins cinq, dont la CDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé d'utiliser sept concentrations plus un témoin négatif, de même qu'un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
- Nombre de répétitions — Au moins trois par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin; il doit y en avoir quatre par traitement pour la détermination de la CSEO/CMEO.
- Nombre de plantes par traitement — Vingt pointes de branches de plantes femelles et quatre plantes mâles.
- Mode d'exposition — Matière d'essai à sa CDM et à des concentrations plus faibles, mélangée à l'eau de mer dont la salinité est de  $30 \pm 2$  ‰.
- Paramètres statistiques — À la fin de l'essai, pour chaque répétition et chaque traitement, pourcentage de survie des pointes de branches de plantes femelles, nombre moyen ( $\pm$  ET) de cystocarpes par plante et pourcentage de plantes femelles présentant un aspect atypique, y compris des lésions et des cystocarpes dont le développement est anormal; si les données le permettent,  $CL_{50}$  9 jours pour les plantes femelles,  $CE_{50}$  9 jours pour établir le pourcentage de plantes femelles de chaque traitement présentant un aspect atypique,  $CI_{25}$  9 jours pour calculer le nombre de cystocarpes obtenus par plante femelle, CSEO/CMEO pour le nombre de cystocarpes obtenus par plante femelle.
- Comparaisons statistiques — Concentrations expérimentales et témoin négatif à la fin de l'essai, pour détecter toute baisse significative du pourcentage de survie des plantes femelles et pour établir le pourcentage de plantes femelles présentant un aspect atypique et le nombre moyen de cystocarpes par plante femelle à la fin de l'essai; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.
-

Pour cet essai, les paramètres à mesurer sont, pour chaque répétition et chaque traitement, le pourcentage de survie des plantes femelles à la fin de l'essai, le pourcentage de plantes femelles présentant un aspect atypique (p. ex., lésions, tissu nécrotique, anomalies du développement des cystocarpes) et le nombre de cystocarpes que chaque plante femelle a produits. S'il s'agit d'un essai à concentration unique, les valeurs des paramètres établies pour la CDM et pour les traitements témoins négatifs sont comparées statistiquement à l'aide du *test de Student* ou d'une autre méthode de comparaison par paire (EC, 2004d); on procède de la même façon pour comparer les valeurs établies pour chacun des témoins (autres que le négatif) inclus dans l'essai et pour le traitement témoin négatif. Dans le cas d'un essai à concentrations multiples, on calcule la  $CL_{50}$  9 jours pour les plantes femelles, la pente de la courbe de celle-ci, de même que ses limites de confiance de 95 %, si les données le permettent. De plus, la  $CI_{25}$  9 jours en regard du nombre de cystocarpes obtenus par plante femelle sera établie, de même que ses limites de confiance de 95 %, si l'on dispose de suffisamment de données. Toujours si les données le permettent, on doit calculer la CSEO et la CMEO en regard du nombre de cystocarpes par plante femelle et le pourcentage de ces dernières présentant un aspect atypique (EC, 2004d). Si l'essai à concentrations multiples comporte un ou plusieurs témoins autres que le négatif, on procédera à des comparaisons par paire des paramètres statistiques établis pour ce ou ces traitements et pour le traitement témoin négatif, selon la procédure décrite ci-dessus. Il convient de se conformer aux indications du guide des essais d'écotoxicité d'Environnement Canada (EC, 2004d) lors de l'établissement des calculs et des comparaisons.

Comme il est indiqué au tableau 2, cet essai de 9 jours exige une salinité de  $30 \pm 2$  ‰. Étant donné que *C. parvula* ne tolère pas l'eau saumâtre, la méthode d'essai est davantage représentative des conditions du milieu marin que du milieu estuarien.

### 9.2.3 Autres méthodes ou procédures

La méthode d'essai de toxicité chronique servant à mesurer les effets écologiques potentiels de nouvelles substances microbiennes sur une espèce de plante marine (c.-à-d. *C. parvula*) recommandée à la sous-section 9.2.2 a été modifiée afin de permettre la détection d'effets pathogènes également. D'autres modifications, comme une exposition et/ou une

période post-exposition plus longues, pourraient accroître la capacité de détection d'effets pathogènes de certains micro-organismes dont l'infectivité (ou la pathogénicité) est différée de façon notable. Cependant, on ne devrait pas apporter de telles modifications sans procéder d'abord à une expérimentation adéquate et à une validation interlaboratoires de leur influence sur la sensibilité des essais et sur le critère de validité établi pour la méthode d'essai (v. tableau 2). L'application de cette méthode d'essai biologique avec une diversité de nouvelles substances microbiennes fournira à Environnement Canada des données relatives à divers types de micro-organismes (bactéries, virus, champignons et protozoaires). Il sera alors plus facile de déterminer si la méthode d'essai, appliquée conformément à la sous-section 9.2.2, peut permettre de détecter les effets pathogènes tout autant que toxiques de nouvelles substances microbiennes. Au besoin, d'autres modifications procédurales pourraient être apportées par la suite afin d'accroître le rendement de la méthode.

L'USEPA a publié une méthode d'évaluation à court terme de la toxicité chronique d'effluents ou d'eaux réceptrices pour des plantes marines. Cette méthode fait appel à l'algue géante *Macrocystis pyrifera* comme organisme hôte; la germination des spores et la croissance de l'algue servent de paramètres biologiques [section 17 de USEPA (1995)]. Même si cette méthode d'essai est applicable à d'autres espèces de plantes marines, elle n'est pas recommandée pour les essais portant sur de nouvelles substances microbiennes en raison de certaines contraintes. Là encore, il faut utiliser une eau de mer à sa concentration maximale (salinité de  $34 \pm 2$  ‰), de sorte que la méthode ne peut être appliquée aux conditions propres aux estuaires, qui exigent pour les essais une *eau témoin/de dilution* saumâtre. Cet essai est très court (48 h seulement) et ne comporte aucun renouvellement des concentrations expérimentales (USEPA, 1995). Par conséquent, cette méthode d'essai [c.-à-d. la section 17 de USEPA (1995)] ne convient pas aux fins présentes.

Diverses autres méthodes d'essai ont été appliquées à la mesure de la toxicité de substances d'essai pour des microalgues marines ou estuariennes planctoniques en laboratoire (SC et USEPA, 2001). Les essais, qui ont porté sur des diatomées estuariennes ou marines (p. ex., *S. costatum* ou *Thalassiosira pseudonana*) ou des dinoflagellés (p. ex., *Gonyaulax polyedra* ou

*Pyrocystis lunula*), sont généralement très courts (p. ex., 96 h) et ne comportent aucun renouvellement des solutions (ASTM, 2000f,g). Rien n'indique que ces méthodes peuvent convenir à la mesure des effets pathogènes de nouvelles substances microbiennes, mais elles se prêteraient à la mesure des effets toxiques.

L'essai recommandé à la sous-section 9.2.2 pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des plantes estuariennes ou marines, en l'occurrence *C. parvula*,

doit se dérouler à des températures de  $23 \pm 1$  °C. Ces températures conviennent à la plupart des micro-organismes mésophiles, mais elles sont trop élevées pour les micro-organismes psychrophiles. À l'heure actuelle, aucune méthode d'essai biologique normalisée ne convient à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques d'un micro-organisme psychrophile sur une espèce de plante estuarienne ou marine. On devrait encourager la recherche menant à la mise au point d'une telle méthode.

## Essais sur des invertébrés aquatiques

### 10.1 Invertébrés dulcicoles

#### Repères

- L'essai biologique normalisé que l'on recommande d'utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur un invertébré dulcicole pélagique consiste en un essai de 21 jours à renouvellement intermittent sur le cladocère *Daphnia magna*, conforme à OCDE (1998c). La matière d'essai est mélangée à l'eau douce, et les paramètres à mesurer incluent la survie des daphnies parentales et le nombre de jeunes vivants produits par daphnie parentale sur 21 jours.
- Pour la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des invertébrés dulcicoles benthiques, il est recommandé d'utiliser, comme méthode normalisée, les essais de survie et de croissance de larves de chironomes (*Chironomus tentans* ou *C. riparius*) ou de l'amphipode *Hyaella azteca*, mis au point par Environnement Canada (EC, 1997a,b), auxquels des modifications doivent être apportées. Chaque essai comporte le renouvellement intermittent de l'eau sus-jacente au sédiment dans les enceintes expérimentales. Pour les essais à concentration unique, la matière d'essai est mélangée au sédiment et à l'eau sus-jacente. Pour ceux à concentrations multiples, elle est mélangée soit au sédiment, soit à l'eau sus-jacente.
- La méthode d'essai d'Environnement Canada (1997b) faisant appel à *H. azteca* convient également aux essais en eau saumâtre (salinité de  $\leq 15$  ‰).

#### 10.1.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens

Douville (2001) a passé en revue les études de recherche sur les effets pathogènes et/ou toxiques de divers types de micro-organismes (bactéries, virus, protozoaires et champignons) sur des espèces choisies d'invertébrés dulcicoles. Parmi les espèces pélagiques, ce sont des daphnies (puces d'eau) qui étaient le plus souvent utilisées, et les chercheurs se servaient généralement de *Daphnia magna* ou de *Ceriodaphnia dubia* comme organismes d'essai (hôtes). Les études relatives aux invertébrés dulcicoles benthiques exposés à des micro-

organismes faisaient appel à diverses espèces d'amphipodes endogés ou de larves d'insectes, mais aucune méthode ou démarche normalisée et cohérente ne ressort de ces études.

Les lignes directrices de la série 885 de l'USEPA sur les pesticides microbiens ne précisent ni l'espèce ni la méthode d'essai biologique à utiliser pour mesurer les effets de ceux-ci sur des invertébrés dulcicoles (USEPA, 1996d). On peut y lire ce qui suit :

*Si une exposition directe d'organismes aquatiques est prévue, les essais devront porter sur deux espèces d'invertébrés aquatiques : une espèce planctonique et une espèce benthique.*

Pour les essais en eau douce, il est indiqué dans USEPA (1996d) que la matière d'essai doit être administrée sous forme de suspension dans l'eau, qu'il faut utiliser des stades larvaires dans la mesure du possible et que l'essai doit durer au moins 21 jours. Dans EC et SC (2001), on mentionne qu'il faudrait envisager de mener un essai sur des daphnies (*Daphnia* spp. ou *Ceriodaphnia* spp.) pour mesurer les effets écologiques potentiels d'une nouvelle substance microbienne sur des invertébrés dulcicoles. L'ARLA (2001) préconise également l'utilisation de daphnies dulcicoles pélagiques (p. ex., *D. magna*) à cette fin.

Aux États-Unis, des laboratoires privés menant des essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'agents ou de produits microbiens ont mis au point, à l'interne, des modes opératoires normalisés applicables à des essais de 21 jours à renouvellement intermittent sur *D. magna*; ces modes opératoires sont compatibles avec les lignes directrices de l'USEPA (1996d) relatives aux essais visant à mesurer les effets d'AAM sur des invertébrés dulcicoles. Les réponses à un questionnaire non officiel envoyé à trois de ces laboratoires en 2002 (v. § 8.8) révèlent que 24 essais de ce type ont été menés avec des AAM ou des PC microbiens, 19 avec des bactéries, 3 avec des virus et 2 avec des champignons. La presque totalité (92 %) de ces 24 essais étaient à concentrations multiples; 79 % d'entre eux comportaient un témoin non infectieux et 46 %, un témoin sur filtrat stérile. Par

contre, aucun n'incluait de témoin microbien positif ou de témoin chimique positif, ni d'essai d'infectivité chez les organismes d'essai (section 5). La plupart (71 %) de ces essais de 21 jours sur *D. magna* comportaient la mesure de la teneur en micro-organismes des suspensions d'essai.

Dans sa réponse au questionnaire non officiel, la division des pesticides microbiens de l'USEPA a indiqué qu'il existait des données sur ~87 essais distincts de 21 jours sur *D. magna* exposée à des AAM ou à leur PC. Sur ce nombre, ~60 visaient des bactéries, ~6 des virus, ~20 des pesticides fongiques et le dernier un AAM renfermant des protozoaires. Au total, ~91 % consistaient en essais à concentration unique, c'est-à-dire la CDM (§ 3.3.1) seulement. Des témoins sur filtrat stérile (v. § 4.5) ne faisaient partie que de ~3 % de ces essais. Environ 45 % comportaient un témoin non infectieux (§ 4.4), mais aucun ne prévoyait de témoin chimique positif (§ 4.2) ou de témoin microbien positif (§ 4.3). Les concentrations microbiennes dans la ou les suspensions d'essai (v. § 3.5) ont été mesurées dans ~61 % des cas, mais aucune tentative n'a été faite pour mesurer l'infectivité (v. section 5) pendant les essais.

Un laboratoire d'essai privé des États-Unis a élaboré son propre mode opératoire normalisé pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité d'AAM pour des larves de chironomes benthiques (*Chironomus tentans*). Il s'agit d'un essai de 21 jours où la matière d'essai est administrée dans l'eau sus-jacente au sédiment de chaque enceinte expérimentale. Le renouvellement de chaque concentration expérimentale dans l'eau sus-jacente a lieu trois fois par semaine pour chaque traitement et pour chaque témoin. À la fin de l'essai, on détermine le nombre et le pourcentage de larves de chironomes qui ont survécu à chaque exposition de 21 jours; on examine aussi chaque larve pour y détecter des signes atypiques (p. ex., lésions ou décoloration) et des histopathologies possibles. À la fin de l'essai également, on mesure la masse sèche afin de déterminer si la matière d'essai a eu des effets nocifs sur la croissance des chironomes. Les résultats du questionnaire de 2002 (v. § 8.8) indiquent que ce mode opératoire normalisé a été appliqué peu souvent à des échantillons de nouvelles substances microbiennes.

### **10.1.2 Méthode d'essai biologique recommandée pour les invertébrés pélagiques**

Il est recommandé de procéder à un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 21 jours employant le cladocère d'eau douce *D. magna* pour mesurer les effets écologiques potentiels d'une nouvelle substance microbienne sur des invertébrés pélagiques dulcicoles. Cette recommandation est en harmonie avec l'utilisation généralisée, par les chercheurs des États-Unis, d'un essai de 21 jours sur *D. magna* exposée à des AAM ou à d'autres substances microbiennes pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de ces matières d'essai sur une espèce appropriée de ce type d'invertébré. L'OCDE a publié des lignes directrices pour la conduite d'un essai de 21 jours à renouvellement intermittent visant à mesurer les effets de substances toxiques sur la survie et la reproduction de *D. magna* (OCDE, 1998c). Cette méthode d'essai biologique, une fois modifiée conformément aux indications fournies ici pour les essais avec de nouvelles substances microbiennes, devrait convenir aux fins présentes. Le tableau 3 présente un résumé des modifications apportées à la méthode, de même que des procédures et conditions applicables à un essai de 21 jours sur les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur la survie et la reproduction de *D. magna*.

Les daphnies sont largement répandues dans les masses d'eau douce (p. ex., étangs et lacs ou cours d'eau calmes) de nombreuses provinces canadiennes. Ces organismes, qui nagent activement dans la colonne d'eau, constituent un lien important dans de nombreuses chaînes alimentaires aquatiques et représentent une source appréciable de nourriture pour les salmonidés (stades juvéniles) et d'autres espèces de poissons. Leur cycle biologique est relativement court et il est facile de les élever en laboratoire. Les daphnies sont sensibles à un large éventail de contaminants aquatiques et sont très souvent utilisées dans les essais visant à mesurer la toxicité d'échantillons de produits chimiques, d'effluents ou d'eaux réceptrices. En raison de leur petite taille, on n'a besoin que de faibles volumes d'eau pour les essais à concentration unique ou à concentrations multiples.

Comme il est indiqué dans OCDE (1998c), l'essai est mis en route avec des groupes de daphnies *néonates* âgées de <24 h. Il se poursuit pendant 21 jours, et chaque concentration expérimentale (y compris les

**Tableau 3 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 21 jours sur le cladocère dulcicole *Daphnia magna***

***Essai universel***

Méthode d'essai	— Conforme à OCDE (1998c), <i>Lignes directrices pour les essais de produits chimiques — Daphnia magna, essai de reproduction.</i>
Type d'essai	— Renouvellement intermittent de chaque concentration expérimentale (y compris les témoins) tout au long de l'essai de 21 jours, trois fois par semaine en des journées non consécutives (p. ex., tous les lundis, mercredis et vendredis).
Organisme d'essai	— <i>D. magna</i> néonates, âgées de <24 h au début de l'essai.
Acclimatation	— Avant le début de l'essai, acclimatation aux conditions de l'essai (température, photopériode, aliments, eau témoin/de dilution) de daphnies provenant d'une seule culture saine, pendant au moins deux générations.
Volume par enceinte expérimentale	— Bécher en verre d'une capacité de 50–100 mL; 50–100 mL de solution/suspension d'essai dans chacun.
Nombre de daphnies par enceinte expérimentale	— Une daphnie néonate au début de l'essai.
Eau témoin/de dilution	— Milieu d'essai M4 ou M5 (Eldent) [annexe 2 de OCDE (1998c)]; d'autres milieux sont acceptables s'ils satisfont au critère de validité de l'essai; teneur recommandée en OD de 90–100 % de la valeur de saturation lorsque l'eau est versée dans les enceintes expérimentales.
Température de l'eau	— 18–22 °C; variation de $\leq 2$ °C à l'intérieur de cette plage.
Éclairage	— Ampoules fluorescentes à lumière blanche et crue ou éclairage en spectre continu dont l'intensité ne doit pas dépasser 15–20 $\mu\text{Einsteins}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ; de préférence, transition graduelle entre clarté et obscurité et vice versa.
pH	— Aucun rajustement si le pH de la ou des concentrations expérimentales se situe entre 6,0 et 8,5; deuxième essai recommandé (pH rajusté) si le pH d'un traitement se situe en dehors de cette plage.
Oxygène dissous	— $\geq 3$ mg/L dans chaque enceinte expérimentale tout au long de l'essai; aucune aération pendant l'essai.
Alimentation	— Préférentiellement une fois par jour et au moins trois fois par semaine tout au long de l'essai, sous forme de suspension concentrée de cellules algales vivantes [conformément à OCDE (1998c)].
Témoins	— Chaque essai doit inclure un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Mode d'exposition	— Matière d'essai mélangée à l'eau douce.
CDM pour l'eau	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/mL d'eau, ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aqueux (v. § 3.3.1.1).
Essai d'infectivité	— Facultatif – la décision à cet égard se fonde sur la teneur mesurée en nouvelle substance microbienne d'homogénats de corps entiers de daphnies parentales au cours et/ou au terme de l'essai.



Mesures	— Mesure de la température, du pH, de la dureté et de l'OD au moins une fois par semaine dans les suspensions/solutions fraîches et âgées; chaque semaine, si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne dans chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai, ainsi qu'au début et à la fin d'au moins un cycle de renouvellement.
Observations	— Tout au long de l'essai, observation quotidienne de la survie des daphnies parentales de chaque enceinte expérimentale; dénombrement quotidien des jeunes vivants dans chaque enceinte, puis enlèvement de ceux-ci.
Paramètres biologiques	— Survie des daphnies parentales et nombre cumulatif de jeunes vivants produits par daphnie parentale; si des daphnies parentales meurent dans une enceinte expérimentale pendant l'essai, il faut exclure cette répétition des analyses.
Validité de l'essai	— Essai invalide dans les cas suivants : survie de <80 % des daphnies parentales du groupe témoin négatif au terme de l'essai; moyenne de <60 % de jeunes vivants par adulte dans le groupe témoin négatif.

### ***Essai à concentration unique***

Nombre de traitements	— Au moins deux (CDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	— Au moins 10 par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre de daphnies par traitement	— $\geq 10$ daphnies néonates (une par enceinte expérimentale de répétition) au début de l'essai.
Paramètres statistiques	— À la fin de l'essai, pourcentage de survie des daphnies parentales de chaque traitement; nombre moyen ( $\pm$ ET) de jeunes produits par daphnie parentale, pour chaque traitement.
Comparaisons statistiques	— CDM et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie et toute baisse du nombre de jeunes produits; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

Nombre de concentrations (ou nombre de traitements)	— Au moins cinq, dont la CDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir aussi un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	— Au moins 10 par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre de daphnies par traitement	— $\geq 10$ daphnies néonates (une par enceinte expérimentale de répétition) au début de l'essai.
Paramètres statistiques	— À la fin de l'essai, pourcentage de survie des daphnies parentales de chaque traitement; nombre moyen ( $\pm$ ET) de jeunes vivants produits par daphnie parentale, pour chaque traitement; si les données le permettent, $CL_{50}$ 21 jours pour les daphnies parentales, $CI_{25}$ 21 jours pour établir le nombre de jeunes produits par daphnie parentale, CSEO/CMEO.
Comparaisons statistiques	— Concentrations expérimentales et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie des daphnies parentales et dans le nombre de jeunes vivants produits par adulte parental; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

---

témoins) est renouvelée trois fois par semaine en des journées non consécutives, par exemple tous les lundis, mercredis et vendredis. Les procédures d'acclimatation et les conditions des essais sont résumées au tableau 3. Chaque essai doit comporter un témoin négatif (v. § 4.1). Il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux (§ 4.4), tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile (§ 4.5) est facultatif, tout comme la mesure de l'infectivité (v. section 5). Les spécifications propres aux essais à concentration unique (§ 3.3.1) ou à concentrations multiples (§ 3.3.2) sur *D. magna* sont résumées au tableau 3. Les organismes d'essai sont exposés à la nouvelle substance microbienne mélangée à un volume mesuré d'eau témoin/de dilution représentant la CDM ou, dans le cas d'un essai à concentrations multiples, la CDM et une série de concentrations plus faibles.

Pour cet essai, les paramètres biologiques sont fondés sur la survie, après 21 jours, des daphnies parentales utilisées au début de l'essai, de même que sur le succès de reproduction.

Pour un essai à concentration unique, les paramètres statistiques à mesurer au terme de l'essai sont le pourcentage de survie des daphnies parentales de chaque traitement et le nombre moyen ( $\pm$  ET) de jeunes vivants produits par daphnie parentale de chaque traitement. Ces mêmes paramètres s'appliquent dans le cas d'un essai à concentrations multiples. Si les données le permettent (v. § 3.3.2), la  $CL_{50}$  21 jours pour les daphnies parentales exposées à une gamme de concentrations de la matière d'essai devrait être établie, de même que la pente de sa courbe et ses limites de confiance de 95 %. La  $CI_{25}$  21 jours en regard du nombre de jeunes vivants produits par daphnie parentale devrait être établie si l'on dispose de suffisamment de données. Toujours si les données le permettent, il faudrait calculer et déclarer la CSEO et la CMEO en regard du nombre de jeunes produits dans chaque traitement pendant les 21 jours de l'essai. Si l'essai à concentrations multiples comporte un ou plusieurs témoins autres que le négatif, on procédera à des comparaisons par paire des paramètres statistiques établis pour ce ou ces traitements et pour le traitement témoin négatif, à l'aide du *test de Student* ou d'une autre méthode statistique appropriée.

Il convient de se conformer aux indications d'ordre statistique de EC (2004d) lors du calcul de chacun de ces paramètres.

### 10.1.3 Méthodes d'essai biologique recommandées pour les invertébrés endogés

Les essais menés en laboratoire pour mesurer la toxicité d'échantillons de sédiments d'eau douce sont maintenant courants au Canada et ailleurs dans le monde. Environnement Canada a publié deux méthodes d'essai biologique permettant d'effectuer de telles mesures sur des larves de chironomes (*C. tentans* ou *C. riparius*) ou sur un amphipode dulcicole (*Hyaella azteca*) (EC, 1997a,b). Ces méthodes, qui prévoient l'utilisation d'espèces sensibles d'invertébrés dulcicoles que l'on trouve dans de nombreuses provinces canadiennes, renferment des instructions détaillées sur la mesure de la toxicité de substances d'essai mélangées à un sédiment *non contaminé*, de même que des conseils sur la réalisation d'essais à concentration unique ou à concentrations multiples. De nombreux laboratoires du Canada et des États-Unis élèvent des *Chironomus* spp. ou des *H. azteca* en vue d'essais de toxicité sublétales au moyen d'échantillons de sédiment d'eau douce; ils ont aussi acquis une vaste expérience dans la conduite de tels essais avec des substances d'essai particulières. Si elles sont modifiées adéquatement, ces méthodes d'essai biologique peuvent servir à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur les espèces précitées d'invertébrés dulcicoles benthiques (invertébrés endogés).

Les tableaux 4 et 5 résument les méthodes que l'on recommande d'utiliser pour effectuer de telles mesures sur des larves de chironomes ou sur l'amphipode dulcicole *H. azteca* (organismes hôtes). Les procédures, conditions et appareils exigés pour chacune des méthodes d'essai biologique sont semblables, tout comme les paramètres biologiques (c.-à-d. la survie à long terme et la croissance des organismes d'essai). Comme il est indiqué dans ces tableaux, les deux méthodes peuvent être appliquées sous forme d'essai à concentration unique ou d'essai à concentrations multiples. Les tableaux récapitulatifs renferment aussi des conseils sur le ou les modes d'exposition, la détermination de la CDM pour ces derniers, la mesure des concentrations de la nouvelle substance microbienne dans le sédiment ou l'eau sus-jacente des enceintes expérimentales, les essais

d'infectivité, les paramètres biologiques et statistiques appropriés, de même que les comparaisons statistiques à établir. Des indications plus détaillées sont fournies dans d'autres sections du présent guide.

Comme il est indiqué aux tableaux 4 et 5, les essais à concentration unique sur des larves de chironomes ou des amphipodes dulcicoles devraient comporter deux modes d'exposition à la matière d'essai : celle-ci doit être mélangée au sédiment et à l'eau sus-jacente. Les CDM applicables à chacun de ces deux modes d'exposition sont décrites à la sous-section 3.3.1 et résumées dans les deux tableaux. Les sous-sections 3.4.1 et 3.4.2 décrivent la façon de procéder pour mélanger et administrer la matière d'essai dans l'eau (sus-jacente) et le sédiment, tandis que les tableaux 4 et 5 renferment des spécifications sur le taux de renouvellement de l'eau sus-jacente. Pour les essais à concentrations multiples, il faudrait utiliser un seul mode d'exposition à la fois (v. § 3.2).

Comme c'est le cas pour d'autres méthodes d'essai avec de nouvelles substances microbiennes, chaque essai sur des larves de chironomes ou des amphipodes dulcicoles doit inclure un témoin négatif (v. § 4.1). Conformément à EC (1997a,b), il faut utiliser un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif) dans le cadre de chacun des essais (ou parallèlement à ceux-ci)<sup>63</sup>. Il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux (§ 4.4), tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile (§ 4.5) est facultatif. La mesure de l'infectivité, effectuée au terme de l'essai sur les homogénats de corps entiers d'amphipodes ou de larves de chironomes de chaque traitement, est également facultative et dépend des objectifs de l'étude (v. section 5).

Chacune des méthodes d'essai biologique recommandées comporte, au terme de l'essai, un examen soigneux des organismes d'essai de chaque enceinte expérimentale. Un tel examen permet de détecter des signes atypiques (p. ex., lésions apparentes ou tissu décoloré ou exfolié). Un stéréomicroscope (p. ex., grossissement de ~240) devrait être utilisé à cette fin. Il faut calculer, pour chaque enceinte et chaque traitement, le pourcentage d'animaux qui présentent des signes évidents de

maladie et/ou d'effets toxiques (c.-à-d. une apparence atypique). Ces données et celles sur le pourcentage de survie et sur la masse sèche des organismes d'essai serviront aux comparaisons statistiques des écarts attribuables au traitement (v. tableaux 4 et 5, « Comparaisons statistiques »).

On utilise les comparaisons par paire, effectuées à l'aide du *test de Student* ou d'une autre méthode statistique appropriée, pour déterminer si les écarts dans les paramètres statistiques calculés pour chaque traitement (p. ex., CDM et témoin négatif; témoin négatif et autre témoin) sont significatifs. Les indications que renferme EC (2004d) sur la détermination et la comparaison des paramètres statistiques des essais de toxicité menés en laboratoire devraient être appliquées, selon le cas.

#### 10.1.4 Autres méthodes ou procédures

**10.1.4.1 Essais de remplacement – invertébrés pélagiques.** L'ISO (1999a) et l'ASTM (2000h) ont publié des méthodes d'essai normalisées pour la mesure de la toxicité à long terme de diverses substances pour *D. magna*. Chacune de ces méthodes peut être appliquée sous forme d'essai de 21 jours à renouvellement intermittent. La méthode décrite dans ISO (1999a) est très semblable à celle que prescrit l'OCDE (1998c). Les paramètres à mesurer dans la méthode de l'ASTM (2000h) sont la croissance des daphnies parentales (masse sèche et/ou longueur de chaque daphnie parentale ayant survécu, à la fin de l'essai), de même que la survie et le nombre de jeunes produits par daphnie parentale. La méthode de l'ISO et celle de l'ASTM peuvent remplacer adéquatement l'essai de 21 jours de l'OCDE (1998c) sur *D. magna* décrit à la sous-section 10.1.2.

Environnement Canada a publié des méthodes d'essai normalisées servant à mesurer la létalité aiguë de substances d'essai sur *D. magna* ou *D. pulex* (EC, 1990a, 2000a). Ces méthodes, qui consistent en essais de 48 h sans renouvellement, n'incluent aucune mesure des effets sublétaux sur la croissance ou la reproduction, ni des effets sur la survie à long terme. Compte tenu de ces lacunes, ces essais de toxicité aiguë ne se prêtent pas à la mesure des effets pathogènes ou toxiques de nouvelles substances microbiennes au terme d'une exposition plus longue. Toutefois, un essai de létalité aiguë sur *D. magna* pourrait être utile sur deux plans : pour déterminer si une matière d'essai donnée peut avoir des effets

<sup>63</sup> Si un toxique de référence est utilisé, on peut procéder à des essais de 96 h sans renouvellement avec de l'eau seulement, pour des raisons d'économie [v. EC (1997a,b) pour les spécifications propres à de tels essais].

**Tableau 4 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 10 jours sur des larves de *Chironomus tentans* ou de *C. riparius***

***Essai universel***

Méthode d'essai	— Conforme à EC (1997a), <i>Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (Chironomus tentans ou Chironomus riparius) dans les sédiments.</i>
Type d'essai	— Renouvellement intermittent de l'eau sus-jacente de chaque enceinte expérimentale, quatre fois pendant l'essai, en des journées non consécutives (p. ex., lundi, mercredi et vendredi).
Organismes d'essai	— <i>C. tentans</i> du troisième stade larvaire ou <i>C. riparius</i> du premier stade ( $\leq 48$ h après l'éclosion) au début de l'essai; toutes doivent provenir du même élevage en laboratoire.
Enceintes expérimentales et volume de sédiment et d'eau	— Bêcher de forme haute de 300 mL; 100 mL de sédiment humide et 175 mL d'eau sus-jacente.
Nombre de larves par enceinte expérimentale	— 10
Eau témoin/de dilution	— Eau douce naturelle ou artificielle; teneur en OD de 90–100 % de la valeur de saturation lorsque l'eau est versée dans les enceintes expérimentales.
Sédiment	— Naturel ou artificiel (préparé en laboratoire).
Température de l'eau	— Température moyenne journalière de $23 \pm 1$ °C tout au long de l'essai.
Éclairage	— En spectre continu (fluorescent ou l'équivalent), par le haut; 500–1000 lux à la surface de l'eau; $16 \pm 1$ h de clarté et $8 \pm 1$ h d'obscurité.
Oxygène dissous	— $\geq 40$ % de la valeur de saturation dans chaque enceinte expérimentale, tout au long de l'essai; aération modérée dans toutes les enceintes expérimentales.
Alimentation	— Flocons moulus d'aliments pour poissons tropicaux, quatre fois seulement, en des journées non consécutives (p. ex., lundi, mercredi et vendredi), à raison de 15,0 mg de matières sèches dans une suspension de 3,75 mL versée dans chaque enceinte expérimentale.
Témoins	— Chaque essai doit comporter un témoin négatif consistant en un sédiment et une eau sus-jacente <i>non contaminés</i> ; il faut déterminer la sensibilité des organismes d'essai à un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Modes d'exposition	— Matière d'essai mélangée à l'eau douce et au sédiment pour un essai à concentration unique; matière d'essai mélangée soit à l'eau douce, soit au sédiment pour un essai à concentrations multiples.
CDM pour l'eau	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/mL d'eau, ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aqueux (v. § 3.3.1.1).
CDM pour le sédiment	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/g de sédiment (masse sèche), ou 1000 fois la concentration de micro-organismes prévue dans l'environnement aqueux (v. § 3.3.1.2).
Essai d'infectivité	— Facultatif – la décision à cet égard se fonde sur la teneur mesurée en nouvelle substance microbienne d'homogénats de corps entiers de chironomes au cours et/ou au terme de l'essai.
Mesures des caractéristiques de l'eau sus-jacente dans les enceintes expérimentales	— Au moins trois fois par semaine, mesure de l'OD et de la température de chaque traitement; au début et à la fin de l'essai, et juste avant le renouvellement des solutions, mesure du pH, de la conductivité et de l'ammoniac de chaque traitement; chaque semaine, si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai ainsi qu'au début et à la fin d'au moins un cycle de renouvellement.

Mesures des caractéristiques du sédiment dans les enceintes expérimentales	— Si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai.
Observations	— Au cours du renouvellement de l'eau sus-jacente, observation du nombre de larves de chironomes à la surface du sédiment, de même que de leur comportement, de leur aspect et de leur survie; à la fin de l'essai, observation de l'aspect macroscopique de chaque organisme d'essai.
Paramètres biologiques	— Survie et aspect macroscopique de chaque organisme d'essai; masse sèche moyenne par organisme, établie pour le groupe de larves de chironomes qui ont survécu dans chaque enceinte expérimentale au terme de l'essai.
Validité de l'essai	— Essai invalide si la survie moyenne après 10 jours est de <70 % dans le traitement témoin négatif; essai invalide si la masse sèche moyenne par individu faisant partie des témoins négatifs est de <0,6 mg ( <i>C. tentans</i> ) ou de <0,5 mg ( <i>C. riparius</i> ) à la fin de l'essai.

### ***Essai à concentration unique***

Nombre de traitements	— Au moins deux (CDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	— Cinq par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre de larves par traitement	— 50 au début de l'essai (5 répétitions de 10 larves par enceinte).
Paramètres statistiques	— Pourcentage de survie des larves de chironomes de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au terme de l'essai; pourcentage d'organismes de chaque enceinte et de chaque traitement présentant un aspect atypique à la fin de l'essai; masse sèche moyenne ( $\pm$ ET) des larves de chironomes ayant survécu, pour chaque traitement, à la fin de l'essai.
Comparaisons statistiques	— CDM et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie, dans le pourcentage de larves présentant un aspect atypique et dans la masse sèche moyenne des larves ayant survécu, à la fin de l'essai; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

Nombre de concentrations (ou nombre de traitements)	— Au moins cinq, dont la CDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir aussi un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	— Cinq par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre de larves par traitement	— 50 au début de l'essai (5 répétitions de 10 larves par enceinte).
Paramètres statistiques	— Pourcentage de survie des larves de chironomes de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au terme de l'essai; pourcentage d'organismes de chaque enceinte et de chaque traitement présentant un aspect atypique à la fin de l'essai; masse sèche moyenne ( $\pm$ ET) des larves de chironomes ayant survécu, pour chaque traitement, à la fin de l'essai; si les données le permettent, $CL_{50}$ 10 jours et $CE_{50}$ 10 jours en regard de l'aspect atypique des larves ayant survécu, $CI_{25}$ 10 jours en regard de la masse des larves ayant survécu, CSEO/CMEO.
Comparaisons statistiques	— Concentrations expérimentales et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie, dans le pourcentage de larves présentant un aspect atypique et dans la masse sèche moyenne des larves ayant survécu, à la fin de l'essai; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

---

**Tableau 5 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 14 jours sur l'amphipode dulcicole *Hyaella azteca***

***Essai universel***

Méthode d'essai	— Conforme à EC (1997b), <i>Méthode d'essai biologique : essai de mesure de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole Hyaella azteca dans les sédiments</i> .
Type d'essai	— Renouvellement intermittent de l'eau sus-jacente de chaque enceinte expérimentale, trois fois par semaine, en des journées non consécutives (p. ex., tous les lundis, mercredis et vendredis).
Organismes d'essai	— Amphipodes âgés de 2–9 jours au début de l'essai; tous doivent provenir du même élevage en laboratoire.
Enceintes expérimentales et volume de sédiment et d'eau	— Bêcher de forme haute de 300 mL; 100 mL de sédiment humide et 175 mL d'eau sus-jacente.
Nombre d'animaux par enceinte expérimentale	— 10
Eau témoin/de dilution	— Eau douce naturelle ou artificielle; teneur en OD de 90–100 % de la valeur de saturation lorsque l'eau est versée dans les enceintes expérimentales.
Sédiment	— Naturel ou artificiel (préparé en laboratoire).
Température de l'eau	— Température moyenne journalière de $23 \pm 1$ °C tout au long de l'essai.
Éclairage	— En spectre continu (fluorescent ou l'équivalent), par le haut; 500–1000 lux à la surface de l'eau; $16 \pm 1$ h de clarté et $8 \pm 1$ h d'obscurité.
Oxygène dissous	— $\geq 40$ % de la valeur de saturation dans chaque enceinte expérimentale, tout au long de l'essai; aération modérée dans toutes les enceintes.
Alimentation	— Flocons moulus d'aliments pour poissons tropicaux, trois fois par semaine, en des journées non consécutives (p. ex., tous les lundis, mercredis et vendredis), à raison de ~6,3 mg de matières sèches dans une suspension de 3,5 mL versée dans chaque enceinte expérimentale.
Témoins	— Chaque essai doit comporter un témoin négatif consistant en un sédiment et une eau sus-jacente <i>non contaminés</i> ; il faut déterminer la sensibilité des organismes d'essai à un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Modes d'exposition	— Matière d'essai mélangée à l'eau douce et au sédiment pour un essai à concentration unique; matière d'essai mélangée soit à l'eau douce, soit au sédiment pour un essai à concentrations multiples.
CDM pour l'eau	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/mL d'eau, ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aqueux (v. § 3.3.1.1).
CDM pour le sédiment	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/g de sédiment (masse sèche), ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aqueux (v. § 3.3.1.2).
Essai d'infectivité	— Facultatif – la décision à cet égard se fonde sur la teneur mesurée en nouvelle substance microbienne d'homogénats de corps entiers de <i>H. azteca</i> au cours et/ou au terme de l'essai.
Mesures des caractéristiques de l'eau sus-jacente dans les enceintes expérimentales	— Au moins trois fois par semaine, mesure de l'OD et de la température de chaque traitement; au début et à la fin de l'essai, et juste avant le renouvellement des solutions, mesure du pH, de la conductivité et de l'ammoniac de chaque traitement; chaque semaine, si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai ainsi qu'au début et à la fin d'au moins un cycle de renouvellement.

Mesures des caractéristiques du sédiment dans les enceintes expérimentales	— Si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai.
Observations	— Au cours du renouvellement de l'eau sus-jacente, observation du nombre d'amphipodes à la surface du sédiment, de même que de leur comportement, de leur aspect et de leur survie; à la fin de l'essai, observation de l'aspect macroscopique de chaque organisme d'essai.
Paramètres biologiques	— Survie et aspect macroscopique de chaque organisme d'essai; masse sèche moyenne par organisme, établie pour le groupe d'amphipodes qui ont survécu dans chaque enceinte expérimentale au terme de l'essai.
Validité de l'essai	— Essai invalide si la survie moyenne après 14 jours est de <80 % dans le traitement témoin négatif; essai invalide si la masse sèche moyenne par individu faisant partie des témoins négatifs est de <0,1 mg à la fin de l'essai.

### ***Essai à concentration unique***

Nombre de traitements	— Au moins deux (CDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	— Cinq par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre d'animaux par traitement	— 50 au début de l'essai (5 répétitions de 10 amphipodes par enceinte).
Paramètres statistiques	— Pourcentage de survie des amphipodes de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au terme de l'essai; pourcentage d'organismes de chaque enceinte et de chaque traitement présentant un aspect atypique à la fin de l'essai; masse sèche moyenne ( $\pm$ ET) des amphipodes ayant survécu, pour chaque traitement, à la fin de l'essai.
Comparaisons statistiques	— CDM et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie, dans le pourcentage d'amphipodes présentant un aspect atypique et dans la masse sèche moyenne des amphipodes ayant survécu, à la fin de l'essai; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

Nombre de concentrations (ou nombre de traitements)	— Au moins cinq, dont la CDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir aussi un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	— Cinq par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre d'animaux par traitement	— 50 au début de l'essai (5 répétitions de 10 amphipodes par enceinte).
Paramètres statistiques	— Pourcentage de survie des amphipodes de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au terme de l'essai; pourcentage d'organismes de chaque enceinte et de chaque traitement présentant un aspect atypique à la fin de l'essai; masse sèche moyenne ( $\pm$ ET) des amphipodes ayant survécu, pour chaque traitement, à la fin de l'essai; si les données le permettent, $CL_{50}$ 14 jours et $CE_{50}$ 14 jours en regard de l'aspect atypique des amphipodes ayant survécu, $CI_{25}$ 14 jours en regard de la masse des amphipodes ayant survécu, CSEO/CMEO.
Comparaisons statistiques	— Concentrations expérimentales et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie, dans le pourcentage d'amphipodes présentant un aspect atypique et dans la masse sèche moyenne des amphipodes ayant survécu, à la fin de l'essai; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

---

toxiques aigus et pour choisir les concentrations à utiliser dans un essai définitif à concentrations multiples de 21 jours pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une matière d'essai sur cette espèce de daphnie.

Environnement Canada (1992c) et l'USEPA (2002a, section 13) ont chacun publié une méthode pour mesurer à court terme la toxicité chronique d'échantillons de substances d'essai pour la daphnie dulcicole *C. dubia*. Dans les deux cas, l'essai ne dure que  $7 \pm 1$  jours. Les paramètres à mesurer sont la survie et le succès de reproduction. Même si ces méthodes d'essai constituent un moyen rapide de mesurer la toxicité chronique de divers types de substance d'essai, il n'est pas recommandé de les utiliser pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les daphnies dulcicoles. La méthode recommandée ici, c'est-à-dire un essai de 21 jours sur *D. magna* (v. § 10.1.2), offre plus d'avantages qu'un essai de  $7 \pm 1$  jours sur *C. dubia*, notamment une plus grande probabilité de détection des effets pathogènes de la matière d'essai (du fait que l'essai dure plus longtemps).

**10.1.4.2 Essais de remplacement – invertébrés endogés.** L'USEPA a publié une deuxième édition de ses méthodes servant à mesurer la toxicité de contaminants associés aux sédiments pour les invertébrés dulcicoles (USEPA, 2000). Cette nouvelle édition décrit quatre méthodes d'essai biologique applicables à des échantillons de sédiment :

- 1) essai de survie et de croissance de *C. tentans* sur 10 jours;
- 2) essai sur le cycle biologique de *C. tentans*, qui inclut comme paramètres le succès de reproduction, de même que la survie et la croissance;
- 3) essai de survie et de croissance de *H. azteca* sur 10 jours;
- 4) essai de 42 jours sur *H. azteca*, qui sert à mesurer les effets de contaminants donnés sur la survie, la croissance et le succès de reproduction.

Dans le cas des essais plus longs sur *C. tentans* ou *H. azteca*, les résultats concernant le succès de reproduction variaient davantage que ceux sur la

survie ou la croissance (USEPA, 2000). Cela étant, certaines nouvelles substances microbiennes peuvent ne pas avoir d'effets pathogènes sur des larves de chironomes ou sur l'amphipode dulcicole *H. azteca* au cours d'une exposition de 10–14 jours. Dans un tel cas, les essais de plus longue durée prescrits par l'USEPA (2000) pour ces organismes d'essai pourraient convenir s'ils sont adaptés adéquatement en vue de leur application à de nouvelles substances microbiennes, conformément aux prescriptions de la sous-section 10.1.3.

**10.1.4.3 Essais sur des micro-organismes mésophiles ou psychrophiles.** Les trois méthodes d'essai biologique recommandées aux sous-sections 10.1.2 et 10.1.3 pour les invertébrés dulcicoles prévoient des températures chaudes (c.-à-d. 18–22 °C dans le cas de *D. magna* et  $23 \pm 1$  °C dans celui des *Chironomus* spp. ou de *H. azteca*). Ces températures conviennent à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques de micro-organismes mésophiles, mais non de micro-organismes psychrophiles. À l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode d'essai normalisée pour la mesure en laboratoire, dans des conditions d'eau froide, des effets écologiques de micro-organismes psychrophiles. Pour combler cette lacune, on devrait encourager la recherche menant à la mise au point d'une méthode qui pourrait servir à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de micro-organismes psychrophiles sur des invertébrés dulcicoles. Il serait peut-être possible de mener un essai de 21 jours (ou plus) sur *D. magna* à des températures ne dépassant pas 15 °C, une fois les organismes acclimatés à des conditions d'eau froide. Cependant, il faudrait procéder à des essais préliminaires pour déterminer les taux habituels de reproduction des daphnies parentales dans l'eau témoin du traitement négatif afin de s'assurer qu'ils sont acceptables en regard des températures d'essai choisies. Avant de modifier et d'adapter l'essai de 21 jours sur *D. magna* recommandé à la sous-section 10.1.2, il faudrait réévaluer et changer au besoin le critère de validité de l'essai fondé sur le nombre minimal de jeunes produits par daphnie parentale, afin que la méthode puisse être considérée comme normalisée et adaptée à des conditions d'eau froide et à des micro-organismes psychrophiles.



## 10.2 Invertébrés estuariens ou marins

### Repères

- L'essai biologique normalisé que l'on recommande d'utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur un invertébré épibenthique estuarien ou marin consiste en un essai de 30 jours à renouvellement intermittent sur le bouquet (crevette) euryhalin *Palaemonetes vulgaris*, conforme à celui décrit dans USEPA (1996e). Pour cet essai, qui fait appel à des bouquets adultes disponibles sur le marché, il faut choisir une salinité et une température à l'intérieur des plages de 10–35 ‰ et de 5–25 °C, respectivement. Après une exposition de 30 jours, on mesure les effets de la matière d'essai sur la survie, l'aspect et le comportement des bouquets. Il faut aussi procéder à l'autopsie des bouquets en vue de détecter les changements macroscopiques dans les tissus ou les organes et, le cas échéant, les effets histologiques.
- En ce qui a trait à la mesure de la pathogénicité et/ou de la toxicité de nouvelles substances microbiennes pour des invertébrés benthiques (endofaune) estuariens ou marins, on recommande d'utiliser, comme méthode normalisée, une version modifiée de l'essai de 28 jours, mis au point par l'USEPA (1993), pour évaluer la bioaccumulation de contaminants chez le mollusque endogé euryhalin *Macoma balthica*. Cet essai comporte le renouvellement intermittent de l'eau sus-jacente au sédiment dans les enceintes expérimentales. Il faut choisir une salinité et une température à l'intérieur des plages de 10–35 ‰ et de 5–25 °C ( $\pm 2$  °C), respectivement. Pour les essais à concentration unique, la matière d'essai est mélangée au sédiment et à l'eau sus-jacente. Pour ceux à concentrations multiples, elle est mélangée soit au sédiment, soit à l'eau sus-jacente.
- L'essai de 28 jours à renouvellement intermittent sur des moules bleues (*Mytilus edulis*), des huîtres (*Crassostrea* spp.) ou des pétoncles (*Pecten* spp.), décrit dans ASTM (2000i), peut être envisagé, une fois adapté, comme essai de remplacement sur des invertébrés épibenthiques estuariens (s'il s'agit de *M. edulis*) ou marins. Il porte sur des adultes de ces espèces et offre de la souplesse pour ce qui est des conditions de température; dans le cas de *M. edulis*, on peut se servir de micro-organismes psychrophiles ou mésophiles. Une version modifiée de l'essai de 7 jours à renouvellement intermittent sur des mysidacés (*Mysidopsis bahia*) de l'USEPA (2002b) peut constituer une autre solution de rechange, mais cet essai exige des températures chaudes ( $26 \pm 1$  °C) et ne convient qu'à des micro-organismes mésophiles.

- L'essai de 14 jours à renouvellement intermittent sur le ver polychète *Polydora cornuta*, une espèce endogée euryhaline, décrit dans EC (2001a), peut aussi être envisagé, une fois adapté, comme essai de remplacement sur le bivalve endogé *M. balthica*. Comme il exige des températures de  $23 \pm 1$  °C, il ne convient pas à des micro-organismes psychrophiles. On peut aussi adapter l'essai de 28 jours à renouvellement intermittent sur l'amphipode endogé euryhalin *Leptocheirus plumulosus*, décrit dans USEPA (2001); du fait qu'il se déroule à  $25 \pm 2$  °C, il ne s'applique qu'aux micro-organismes mésophiles.

### 10.2.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens

Un certain nombre d'espèces et de stades biologiques d'invertébrés estuariens ou marins ont été exposés en laboratoire à des micro-organismes ou à des produits microbiens. Les méthodes et organismes d'essai utilisés dans les études examinées par Douville (2001) incluent les suivants :

- essai sans renouvellement avec des insecticides fongiques, à une salinité de 20 ‰, en vue de mesurer les CL<sub>50</sub> 96 h pour des mysidacés (*Mysidopsis bahia*) âgés de  $\leq 24$  h;
- essai sans renouvellement avec des insecticides fongiques, viraux et bactériens, à des salinités de 24–28 ‰, en vue de mesurer les CL<sub>50</sub> 48 h pour des larves de mactres d'Amérique nains (*Mulinia lateralis*);
- essai de 27 jours d'infectivité et de pathogénicité de spores bactériennes pour des huîtres américaines adultes (*Crassostrea virginica*);
- essai d'infectivité et de pathogénicité de spores bactériennes ou fongiques, à une salinité de 15 ‰, pour des huîtres américaines exposées pendant 3–14 jours;
- essai sans renouvellement avec des spores fongiques, en vue de mesurer les CL<sub>50</sub> 6–9 jours pour des embryons de bouquets (*Palaemonetes pugio*);
- essais de 15 jours sans renouvellement avec des champignons pathogènes, à une salinité de 20 ‰, en vue de mesurer leurs effets sur la survie et le développement d'embryons de bouquets (*P. pugio*);

- essai de 23 jours à renouvellement intermittent avec un insecticide fongique, à une salinité de 20 ‰, en vue de mesurer la survie et les anomalies du développement de larves de bouquets (*P. pugio*);
- essais de 7 jours avec un insecticide fongique, à une salinité de 20 ‰, en vue de mesurer la survie de bouquets adultes (*P. pugio*);
- essai de 30 jours avec un virus d'insecte donné comme aliment à des bouquets adultes (*P. vulgaris*), à une salinité de 25 ‰, en vue de mesurer la survie et de détecter des histopathologies.

Cette dernière méthode a reçu l'aval de l'USEPA et fait partie de ses lignes directrices relatives aux effets pathogènes et/ou toxiques de pesticides microbiens sur des invertébrés estuariens ou marins (USEPA, 1996e). Au moins un laboratoire privé des États-Unis a élaboré son propre mode opératoire normalisé pour mesurer l'infectivité et la pathogénicité et/ou la toxicité d'AAM pour des bouquets adultes (*P. vulgaris*), conformément à USEPA (1996e). Dans sa réponse au questionnaire de 2002 (v. § 8.8), la division des pesticides microbiens de l'USEPA signale que 5 essais de 30 jours à concentration unique (CDM) ont été menés sur *P. vulgaris* exposé à des AAM bactériens (2), viraux (2) ou fongiques (1). L'un d'eux a permis de détecter des effets pathogènes et/ou toxiques positifs. Aucun des cinq essais ne comportait de témoin sur filtrat stérile ou de témoin microbien positif, tandis que deux incluaient un témoin non infectieux; les cinq essais incluaient la mesure de l'infectivité. Dans trois cas, les concentrations microbiennes ont été mesurées pour chaque traitement d'essai.

Les laboratoires privés qui ont répondu au questionnaire de 2002 ont signalé six essais sur des bouquets adultes (*P. vulgaris*) exposés à des AAM bactériens ou à leur PC. Une concentration unique (c.-à-d. la CDM) a été utilisée pour les six essais, et aucun de ces derniers n'a mis en lumière des effets pathogènes et/ou toxiques. Les six essais comportaient un témoin non infectieux; deux incluaient un témoin sur filtrat stérile et aucun ne prévoyait de témoin microbien positif ou de témoin chimique positif. L'infectivité a été mesurée dans un seul cas, et la concentration bactérienne à laquelle les

bouquets de chaque traitement étaient exposés a été établie pour les six essais.

Lorsqu'elle a répondu au questionnaire de 2002, la division des pesticides microbiens de l'USEPA n'a pas mentionné de rapports d'essais sur des invertébrés estuariens ou marins endogés exposés en laboratoire à des AAM ou à des produits microbiens. Les laboratoires privés des États-Unis qui ont répondu au questionnaire font état de données sur un tel essai, lequel a été mené sur des huîtres adultes (*C. virginica*) exposées à un AAM bactérien pendant 4 jours. Cet essai à concentrations multiples a mis en lumière un effet pathogène et/ou toxique.

#### **10.2.2 Méthode d'essai biologique recommandée pour les invertébrés épibenthiques**

Il est recommandé de procéder à un essai de 30 jours sur le bouquet euryhalin *P. vulgaris* pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur une espèce d'invertébré pélagique ou épibenthique présent dans l'environnement estuarien ou marin. La méthode associée à cet essai est conforme aux lignes directrices de l'USEPA (1996e) applicables aux crevettes. *P. vulgaris* est présent dans les eaux estuariennes le long des côtes de l'Atlantique et du golfe du Mexique. Même si l'espèce n'a aucune valeur commerciale ou récréative en tant qu'aliment pour les humains, elle a une importance écologique du fait qu'elle constitue un maillon du transfert d'énergie entre les niveaux trophiques de la chaîne alimentaire côtière. Des espèces halieutiques d'importance commerciale en consomment de grandes quantités. *P. vulgaris* se nourrit de déchets, d'algues et de plantes mortes, de même que de matière animale.

Des études menées sur le terrain et en laboratoire montrent que les *P. vulgaris* adultes peuvent tolérer des salinités allant de <5 ‰ à >40 ‰ (Anderson, 1985). Comme l'espèce est euryhaline, on peut mener les essais à une salinité de 10–35 ‰ ( $\pm 2$  ‰ de la valeur choisie) afin de refléter les conditions des milieux estuarien ou marin.

L'espèce est également eurytherme. Les adultes peuvent tolérer des températures de 5–35 °C (Anderson, 1985). Étant donné l'étendue de cette plage de tolérance, l'essai de 30 jours visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne sur *P. vulgaris* peut

se dérouler à des températures comprises entre 5 °C et 25 °C<sup>64</sup>, d'où la possibilité d'évaluer des micro-organismes tant psychrophiles que mésophiles. Au cours d'un même essai, il est conseillé de maintenir la température à l'intérieur de la plage de 5–25 °C en tout temps; l'écart par rapport à la température moyenne ne devrait pas être supérieur à  $\pm 2$  °C. Avant la mise en route de l'expérience, les organismes d'essai devraient être acclimatés graduellement ( $\leq 3$  °C/jour) à la température choisie; une fois celle-ci atteinte, l'acclimatation doit se poursuivre pendant au moins 14 jours.

Le tableau 6 présente un résumé de la méthode recommandée pour mener un essai de 30 jours sur *P. vulgaris*, de même que des procédures et conditions applicables à la mesure de la pathogénicité et/ou de la toxicité de nouvelles substances microbiennes au moyen de cet essai. Dans le cas d'un essai à concentration unique, les bouquets sont exposés à la matière d'essai mélangée à l'eau d'essai (au départ et à chaque renouvellement) et aux aliments, à la CDM de chacun de ces substrats (v. § 3.3.1 et tableau 6). Si l'on procède à un essai à concentrations multiples, on devrait mesurer séparément les effets de chacun de ces modes d'exposition (v. § 3.2). Il convient de se conformer aux indications fournies aux sous-sections 3.4.1 (eau) et 3.4.4 (aliments) lors du mélange de la matière d'essai à l'eau ou à la nourriture (c.-à-d. aliments du commerce pour poissons, sous forme de flocons ou de boulettes).

On peut se procurer les organismes d'essai adultes auprès d'un fournisseur commercial. Les animaux utilisés pour les essais devraient être approximativement de la même taille. Ainsi, la longueur du plus gros bouquet inclus dans l'essai ne devrait pas être de plus de deux fois supérieure à celle du plus petit. Une fois les bouquets acclimatés aux conditions du laboratoire (v. tableau 6), on en met 10 (30/traitement) dans chaque enceinte expérimentale au début de l'essai. On doit utiliser des aquariums en verre transparent d'une capacité de  $\geq 20$  L, chacun contenant 15 L de la solution/suspension d'essai. La profondeur de l'eau de chaque enceinte expérimentale doit être de  $\geq 14$  cm, et la densité de chargement, de  $\leq 0,8$  g/L en tout temps. Chaque suspension/solution d'essai doit être renouvelée au moins deux fois par

semaine tout au long de l'essai de 30 jours. Il est conseillé d'observer la survie, l'aspect et le comportement des bouquets de chaque enceinte expérimentale tous les jours et au terme de l'essai.

Il faut prévoir trois aquariums (enceintes expérimentales) de répétition pour chaque traitement, y compris chaque concentration expérimentale, le témoin négatif et tout autre témoin inclus dans l'essai. L'essai doit comprendre un témoin négatif (v. § 4.1). Il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux (§ 4.4), tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile (§ 4.5) est facultatif, tout comme la mesure de l'infectivité (v. section 5).

Les paramètres biologiques sont fondés sur la survie après 30 jours, de même que sur l'aspect et le comportement des bouquets de chaque enceinte expérimentale pendant l'essai et au terme de celui-ci. Au cours des observations quotidiennes, tout bouquet mort doit être enlevé de l'enceinte et soumis à un examen macroscopique détaillé de ses tissus et organes externes et (après dissection) internes. Le jour 30, chacun des bouquets encore vivants de chaque traitement (et du traitement témoin négatif) doit être tué et soumis au même type d'examen macroscopique. Le ou les responsables des essais devraient bien connaître les procédures d'autopsie acceptées et normalisées applicables aux crevettes (p. ex., v. Bell et Lightner, 1988); ces procédures devraient être observées au cours de chaque autopsie. Si des signes de pathologie sont évidents, il faudrait disséquer le ou les tissus et organes touchés, les préserver et les conserver à part en vue d'un examen microscopique ultérieur, le cas échéant. Ces tissus et organes devraient aussi être homogénéisés; il faudrait, si possible, procéder à une culture du micro-organisme et confirmer son infectivité.

Dans le cas d'un essai à concentration unique, les paramètres statistiques à mesurer au terme de l'essai de 30 jours incluent les suivants :

- 1) pour chaque enceinte expérimentale et chaque traitement, pourcentage de survie des bouquets;
- 2) pour chaque enceinte expérimentale et chaque traitement, pourcentage de bouquets affichant un comportement atypique (p. ex., bouquets faisant surface, nage irrégulière, perte d'équilibre);

<sup>64</sup> Des températures supérieures à 25 °C ne sont pas réalistes dans le cas des eaux côtières canadiennes.

**Tableau 6 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 30 jours sur le bouquet euryhalin *Palaemonetes vulgaris***

**Essai universel**

Méthode d'essai	— Conforme à USEPA (1996e), <i>Microbial Pesticide Test Guidelines — Estuarine and Marine Animal Testing, Tier I</i> .
Type d'essai	— Renouvellement intermittent de chaque concentration expérimentale (y compris les témoins) au moins deux fois par semaine tout au long de l'essai de 30 jours.
Organisme d'essai	— Bouquets ( <i>P. vulgaris</i> ) adultes de taille semblable (la longueur du plus gros bouquet ne devrait pas être de plus de deux fois supérieure à celle du plus petit) provenant d'un fournisseur commercial.
Acclimatation	— Acclimatation graduelle aux conditions de l'essai (salinité, température, éclairage); une fois ces conditions atteintes, maintien des organismes d'essai pendant 14 jours avant l'essai; la mortalité ne doit pas dépasser 10 % les deux derniers jours précédant l'essai.
Volume par enceinte expérimentale	— Aquariums en verre transparent d'une capacité de $\geq 20$ L; 15 L de solution/suspension d'essai dans chacun.
Profondeur et densité de chargement	— $\geq 14$ cm dans chaque enceinte expérimentale; densité de chargement de $\leq 0,8$ g/L.
Nombre de bouquets par enceinte expérimentale	— 10
Eau témoin/de dilution	— Eau de mer naturelle ou artificielle; salinité de 10–35 ‰; teneur en OD de 90–100 % de la valeur de saturation lorsque l'eau est versée dans les enceintes expérimentales.
Température de l'eau	— 5–25 °C; variation acceptable à l'intérieur de cette plage : $\pm 2$ °C de la température moyenne.
Éclairage	— Ampoules fluorescentes à lumière blanche et crue ou éclairage en spectre continu, 300–1000 lux à la surface de l'eau; normalement, $16 \pm 1$ h de clarté et $8 \pm 1$ h d'obscurité; de préférence, transition graduelle entre clarté et obscurité et vice versa.
pH	— Aucun rajustement si le pH de la ou des concentrations expérimentales se situe entre 7,0 et 8,5; deuxième essai recommandé (pH rajusté) si le pH d'un traitement se situe en dehors de cette plage.
Oxygène dissous	— $\geq 60$ % de la valeur de saturation dans chaque enceinte expérimentale, tout au long de l'essai; aération modérée dans toutes les enceintes expérimentales.
Alimentation	— À volonté une fois par jour pendant l'acclimatation et l'essai, sous forme d'aliments pour poissons du commerce; pendant l'essai, une quantité mesurée de la matière d'essai mélangée aux aliments doit être ajoutée à la concentration expérimentale.
Témoins	— Chaque essai doit inclure un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Modes d'exposition	— Matière d'essai mélangée à l'eau de mer et aux aliments pour un essai à concentration unique; matière d'essai mélangée soit à l'eau de mer, soit aux aliments pour un essai à concentrations multiples.
CDM pour l'eau	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/mL d'eau, ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aqueux (v. § 3.3.1.1).
CDM pour les aliments	— 100 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aquatique (v. § 3.3.1.3).
Essai d'infectivité	— Facultatif – la décision à cet égard se fonde sur la teneur mesurée en nouvelle substance microbienne d'homogénats de corps entiers de bouquets adultes au cours et/ou au terme de l'essai.

Mesures	— Mesure de la température, du pH, de la salinité et de l'OD au début et à la fin de chaque renouvellement de l'eau, pour au moins une répétition de chaque traitement; chaque semaine, si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai ainsi qu'au début et à la fin d'au moins un cycle de renouvellement.
Observations	— Tous les jours et à la fin de l'essai, observation du pourcentage de survie des bouquets dans chaque enceinte expérimentale; autopsie de chaque spécimen mort pendant l'essai et au terme de celui-ci, pour évaluer toute anomalie macroscopique externe et interne; histologie de tissus et d'organes choisis, le cas échéant.
Paramètres biologiques	— Survie, aspect (y compris au moment de l'autopsie pratiquée à la fin de l'essai) et comportement des spécimens de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au cours et au terme de l'essai.
Validité de l'essai	— Essai invalide si la survie est de <80 % dans le groupe témoin négatif à la fin de l'essai.

### ***Essai à concentration unique***

Nombre de traitements	— Au moins deux (CDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	— Trois par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre de bouquets par traitement	— 30 (10 par répétition), au début de l'essai.
Paramètres statistiques	— Pourcentage de survie des bouquets de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au terme de l'essai; pour chaque enceinte et chaque traitement, pourcentage d'organismes ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique à la fin de l'essai.
Comparaisons statistiques	— CDM et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie et dans le pourcentage de bouquets ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

Nombre de concentrations (ou nombre de traitements)	— Au moins cinq, dont la CDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	— Trois par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre de bouquets par traitement	— 30 (10 par répétition), au début de l'essai.
Paramètres statistiques	— Pourcentage de survie des bouquets de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au terme de l'essai; pour chaque enceinte et chaque traitement, pourcentage d'organismes ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique à la fin de l'essai; si les données le permettent, $CL_{50}$ 30 jours et $CE_{50}$ 30 jours en regard du pourcentage d'organismes ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique à la fin de l'essai, CSEO/CMEO.
Comparaisons statistiques	— Concentrations expérimentales et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie et dans le pourcentage de bouquets ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

---

- 3) pour chaque enceinte expérimentale et chaque traitement, pourcentage de bouquets dont un ou plusieurs organes ou tissus sont d'apparence anormale (p. ex., lésions externes ou internes, œil opaque ou présentant des signes d'hémorragie, décoloration ou autre aspect atypique de l'hépatopancréas).

Une fois établies pour la CDM et pour tout traitement témoin autre que le négatif, les valeurs respectives de ces paramètres devraient être comparées à celles établies pour le témoin négatif, à l'aide d'un test statistique permettant des comparaisons par paire, comme le *test de Student*. Il convient de consulter les méthodes statistiques que renferme le guide des essais d'écotoxicité d'Environnement Canada (EC, 2004d) pour déterminer les paramètres à mesurer ainsi que pour choisir et appliquer les méthodes appropriées.

Les paramètres statistiques décrits ci-dessus s'appliquent également aux essais à concentrations multiples. Si les données le permettent (v. § 3.3.2), la  $CL_{50}$  30 jours de la matière d'essai devrait être établie, de même que la pente de sa courbe et ses limites de confiance de 95 %. On devrait aussi calculer la  $CE_{50}$  30 jours d'après l'aspect et/ou le comportement atypiques de chaque bouquet exposé à chaque traitement, ainsi que la pente de sa courbe et ses limites de confiance de 95 %, si l'on dispose de suffisamment de données. Toujours si les données le permettent, il faudrait calculer et déclarer la CSEO et la CMEO en regard de la survie après 30 jours, de même que les valeurs à attribuer à l'aspect et/ou au comportement atypiques des bouquets. EC (2004d) renferme des conseils sur les logiciels (et leur application) à utiliser pour déterminer la  $CL_{50}$  ou la  $CE_{50}$  ou pour calculer la CMEO et la CSEO. En outre, on devrait consulter ce document lors du choix des méthodes statistiques applicables aux données tirées de l'étude sur l'aspect (y compris celui observé lors des autopsies) et le comportement des bouquets.

### **10.2.3 Méthode d'essai biologique recommandée pour les invertébrés benthiques (endofaune)**

Il est recommandé de procéder à un essai de 28 jours sur le mollusque bivalve euryhalin *Macoma balthica* pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur une espèce d'invertébré endogé représentant le benthos de l'environnement estuarien ou marin. La méthode décrite ici consiste en une adaptation de l'essai de

28 jours servant à évaluer, chez une espèce endogée, la bioaccumulation de contaminants présents dans des échantillons d'un sédiment lité, que l'USEPA a publié en 1993 et dans lequel *M. balthica* compte parmi les organismes d'essai recommandés. Les procédures et conditions associées à la méthode d'essai résumée ici (v. tableau 7) sont semblables à celles décrites à la sous-section 10.1.3 pour les méthodes d'essai biologique qu'il est recommandé d'utiliser en vue de mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les invertébrés benthiques dulcicoles (c.-à-d. les larves de *C. tentans* ou de *C. riparius*, ou encore l'amphipode *H. azteca*).

*M. balthica* fréquente les milieux estuariens et marins des côtes canadiennes de l'Atlantique, du Pacifique et de l'Arctique. Ce mollusque bivalve vit à quelques centimètres sous la surface du sable, de la vase ou du sable boueux. Il est présent dans les portions supérieures des zones intertidales jusque dans les zones infratidales, particulièrement dans les estuaires et les bas-fonds intertidaux (Budd et Rayment, 2001). *M. balthica* constitue une importante source alimentaire pour les oiseaux, les poissons, les crustacés et les vers polychètes. Les mâles et les femelles sont de petite taille ( $\leq 6$  mm) lorsqu'ils atteignent leur maturité sexuelle, mais leur coquille peut atteindre jusqu'à 25 mm de largeur. Les *M. balthica* adultes, qui sont des dépositivores et des suspensivores, se nourrissent activement de diatomées, de plancton déposé, de phytoplancton en suspension et de détritiques. En laboratoire, on observe un taux élevé ( $\geq 90$  %) de survie après 28 jours de jeûne si l'approvisionnement en eau de mer naturelle non contaminée est suffisant (USEPA, 1993). Les adultes de l'espèce s'adaptent facilement à diverses plages de salinité et de température; ils sont utiles en laboratoire pour les essais menés avec des échantillons de sédiments contaminés (ou susceptibles de l'être).

*M. balthica* est un petit bivalve euryhalin sensible aux contaminants; il est tout indiqué pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité de nouvelles substances microbiennes susceptibles de se trouver et de se multiplier dans les sédiments estuariens ou marins. L'essai de 28 jours mené conformément à la méthode décrite au tableau 7 peut être réalisé à une salinité et à une température choisies à l'intérieur des plages de 10–35 ‰ et de 5–25 °C, respectivement. Il convient donc à la mesure des effets écologiques potentiels de

micro-organismes psychrophiles et mésophiles dans un environnement estuarien ou marin. On se sert de grands béciers (2 L) ou d'aquariums en verre et l'on maintient des groupes de répétition de mollusques (10 par enceinte expérimentale) dans le sédiment recouvert d'eau de mer. La matière d'essai microbienne est mélangée à l'eau de mer et/ou au sédiment (v. § 3.2, 3.3 et 3.4). Tout au long de l'essai, on procède au renouvellement intermittent (USEPA, 1993) de l'eau de mer sus-jacente (qu'elle contienne ou non une concentration donnée de la matière d'essai) trois fois par semaine, en des journées non consécutives.

Les paramètres sont fondés sur la survie de *M. balthica* adultes exposés à chacun des traitements, de même que sur l'aspect de leurs tissus et organes observé au cours de l'autopsie pratiquée au terme de l'essai selon les procédures applicables aux mollusques bivalves (p. ex., Shuster et Eble, 1961; Elston et coll., 1987). Du fait que l'essai dure 28 jours, on peut obtenir une quantité suffisante de tissus de corps entiers pour mesurer l'infectivité pendant l'essai et/ou au terme de celui-ci (v. section 5).

Les *M. balthica* adultes doivent provenir d'une même source (un lieu non contaminé), être de taille similaire et appartenir à la même classe d'âge annuelle (tableau 7). Lorsqu'ils arrivent au laboratoire, les organismes utilisés pour les essais devraient être acclimatés graduellement (changement de température : pas plus de 3 °C/jour; rajustement de la salinité : pas plus de 5 ‰/jour) à la température et à la salinité choisies pour l'essai; une fois celles-ci atteintes, l'acclimatation doit se poursuivre pendant au moins 7 jours avant le début des essais (USEPA, 1993). Dix mollusques sont ensuite transférés au hasard dans chacune des enceintes expérimentales de répétition contenant la même quantité de sédiment et d'eau de mer sus-jacente (aérée) (v. tableau 7). Les paramètres biologiques sont fondés sur la survie des mollusques exposés à chacun des traitements, de même que sur l'aspect des tissus et organes observé au cours de l'autopsie pratiquée sur les organismes qui ont survécu [conformément à Shuster et Eble (1961) ou à Elston et coll. (1987), p. ex.]. Au cours de l'autopsie, on note le nombre et le pourcentage de mollusques de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement présentant des signes d'anomalie.

La méthode d'essai recommandée peut prendre la forme d'un essai à concentration unique (c.-à-d. la matière d'essai à sa CDM, plus un témoin négatif et, selon ce que prévoit le plan de l'étude, un ou plus d'un témoin additionnel) ou d'un essai à concentrations multiples. Pour les essais à concentration unique, la matière d'essai est mélangée à l'eau d'essai utilisée pour chacun des renouvellements, de même qu'au sédiment de chaque enceinte expérimentale. Les CDM applicables à chacun de ces deux modes d'exposition sont décrites à la sous-section 3.3.1 et résumées au tableau 7. Les sous-sections 3.4.1 et 3.4.2 décrivent la façon de procéder pour mélanger et administrer la matière d'essai dans l'eau (sus-jacente) et le sédiment, tandis que le tableau 7 renferme des spécifications sur le taux de renouvellement de l'eau sus-jacente. Pour les essais à concentrations multiples, il faudrait utiliser un seul mode d'exposition à la fois (v. § 3.2).

Chaque essai de 28 jours sur *M. balthica* doit comprendre un témoin négatif (v. § 4.1). Il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux (§ 4.4), tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile (§ 4.5) est facultatif. La mesure de l'infectivité, effectuée au terme de l'essai sur des homogénats de corps entiers d'organismes de chaque traitement, est également facultative et dépend des objectifs de l'étude (v. section 5).

Les paramètres statistiques associés aux essais à concentration unique ou à concentrations multiples sur des *M. balthica* adultes sont résumés au tableau 7. Ce dernier renferme également des indications sur les comparaisons statistiques (p. ex., données dérivées pour le témoin négatif par rapport à celles établies pour la CDM ou pour un ou plusieurs traitements témoins). Pour le calcul et la comparaison des paramètres statistiques, il convient de consulter EC (2004d), qui décrit les méthodes statistiques applicables aux résultats des essais d'écotoxicité menés en laboratoire.

#### 10.2.4 Autres méthodes ou procédures

**10.2.4.1 Essais de remplacement – invertébrés épibenthiques.** La méthode décrite dans ASTM (2002i) peut remplacer l'essai de 30 jours sur le bouquet *P. vulgaris*, recommandé à la sous-section 10.2.2, pour la mesure des effets de matières d'essai sur des invertébrés estuariens ou marins épibenthiques. Il s'agit d'un essai de 28 jours mené

**Tableau 7 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 28 jours sur le mollusque bivalve euryhalin *Macoma balthica***

**Essai universel**

Méthode d'essai	— Adaptée de USEPA (1993), <i>Guidance Manual: Bedded Sediment Bioaccumulation Tests</i> .
Type d'essai	— Renouvellement intermittent de l'eau sus-jacente de chaque enceinte expérimentale, trois fois par semaine, en des journées non consécutives (p. ex., tous les lundis, mercredis et vendredis).
Organismes d'essai	— <i>M. balthica</i> adultes mesurant 6–20 mm, appartenant à la même classe d'âge annuelle et de taille semblable; pour le groupe utilisé dans l'essai, la distance entre la pointe de l'umbo et le bord distal de la valve du plus gros mollusque ne doit pas excéder 1,5 fois celle du plus petit mollusque.
Enceintes expérimentales et profondeur du sédiment et de l'eau	— Bêcher en verre de 2 L ou aquarium (d'une plus grande capacité); profondeur du sédiment : au moins 3 cm; profondeur de l'eau de mer sus-jacente : au moins trois fois celle du sédiment.
Nombre d'animaux par enceinte expérimentale	— 10
Eau témoin/de dilution	— Eau de mer naturelle (non filtrée de préférence); plage de salinité de 10–35 ‰, l'écart avec la salinité de l'eau de porosité du sédiment d'essai étant d'au plus 5 ‰; salinité maintenue à $\pm 2$ ‰ de la moyenne tout au long de l'essai; rajustement en fonction de la température de l'essai avant usage; teneur en OD de 90–100 % de la valeur de saturation lorsque l'eau est versée dans les enceintes expérimentales.
Sédiment	— Naturel ou artificiel (préparé en laboratoire).
Température de l'eau	— Plage acceptable : 5–25 °C; température ne s'écartant pas de plus de 2 °C de la moyenne, tout au long de l'essai.
Oxygène dissous	— 60–100 % de la valeur de saturation dans chaque enceinte expérimentale, tout au long de l'essai; aération modérée dans toutes les enceintes expérimentales.
Ammoniac dissous	— Teneur en ammoniac non ionisé de l'eau de mer sus-jacente dans chaque enceinte expérimentale : au plus 20 µg/L en tout temps.
Éclairage	— En spectre continu (fluorescent ou l'équivalent), par le haut; 400–1000 lux à la surface de l'eau; normalement, $16 \pm 1$ h de clarté et $8 \pm 1$ h d'obscurité.
Alimentation	— Aucune.
Témoins	— Chaque essai doit inclure un témoin négatif constitué de sédiment et d'eau sus-jacente <i>non contaminés</i> ; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Modes d'exposition	— Matière d'essai mélangée à l'eau de mer et au sédiment pour un essai à concentration unique; matière d'essai mélangée soit à l'eau de mer, soit au sédiment pour un essai à concentrations multiples.
CDM pour l'eau	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/mL d'eau, ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aqueux (v. § 3.3.1.1).
CDM pour le sédiment	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/g de sédiment (masse sèche), ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aqueux (v. § 3.3.1.2).
Essai d'infectivité	— Facultatif – la décision à cet égard se fonde sur la teneur mesurée en nouvelle substance microbienne d'homogénats de corps entiers de <i>M. balthica</i> au cours et/ou au terme de l'essai.



Mesures des caractéristiques de l'eau sus-jacente dans les enceintes expérimentales	— Au moins trois fois par semaine, mesure de la température de chaque traitement; au début et à la fin de l'essai, et juste avant le renouvellement des solutions, mesure de l'OD, du pH, de la salinité et de l'ammoniac de chaque traitement; chaque semaine, si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai ainsi qu'au début et à la fin d'au moins un cycle de renouvellement.
Mesures des caractéristiques du sédiment dans les enceintes expérimentales	— Si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai.
Observations	— Au cours du renouvellement intermittent, observation du nombre d'organismes à la surface du sédiment et de leur survie; autopsie de chaque spécimen mort pendant l'essai et au terme de celui-ci, pour évaluer l'aspect macroscopique des organes et des tissus; histologie de tissus et d'organes choisis, le cas échéant.
Paramètres biologiques	— Survie; aspect macroscopique de chaque organisme d'essai lors de l'autopsie.
Validité de l'essai	— Essai invalide si la survie moyenne sur 28 jours est de <90 % dans le groupe témoin négatif à la fin de l'essai.

### ***Essai à concentration unique***

Nombre de traitements	— Au moins deux (CDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	— Trois par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre de mollusques par traitement	— 30 (10 par répétition), au début de l'essai.
Paramètres statistiques	— Pourcentage de survie des organismes de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au terme de l'essai; pour chaque enceinte et chaque traitement, pourcentage de mollusques ayant survécu et présentant un aspect atypique à la fin de l'essai.
Comparaisons statistiques	— CDM et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie et dans le pourcentage de mollusques ayant survécu et dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

Nombre de concentrations (ou nombre de traitements)	— Au moins cinq, dont la CDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	— Trois par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre de mollusques par traitement	— 30 (10 par répétition), au début de l'essai.
Paramètres statistiques	— Pourcentage de survie des mollusques de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au terme de l'essai; pour chaque enceinte et chaque traitement, pourcentage de mollusques ayant survécu et dont des tissus ou des organes ont un aspect atypique à la fin de l'essai; si les données le permettent, CL <sub>50</sub> 28 jours et CE <sub>50</sub> 28 jours en regard des mollusques ayant survécu et dont des organes et/ou des tissus ont un aspect atypique à la fin de l'essai, CSEO/CMEO.
Comparaisons statistiques	— Concentrations expérimentales et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie et dans le pourcentage de mollusques ayant survécu et dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

---

en laboratoire sur diverses espèces de mollusques bivalves, dont la moule bleue *M. edulis*, un organisme filtreur. Cette espèce étant euryhaline et eurytherme, on peut l'utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de micro-organismes mésophiles ou psychrophiles en fonction d'une plage étendue de salinité. *M. edulis* fait souvent l'objet d'études menées en laboratoire et sur le terrain en vue de déterminer et de surveiller les effets de contaminants environnementaux. On sait que la moule bleue est sensible à de nombreux types de micro-organismes pathogènes<sup>65</sup> et à divers contaminants chimiques de l'eau de mer.

Il est conseillé de consulter ASTM (2000i) pour ce qui est des critères d'acclimatation ainsi que des conditions et procédures qui conviennent à un essai de 28 jours sur la moule bleue. Bon nombre des spécifications mentionnées à la sous-section 10.2.2 (y compris au tableau 6) pour un essai de 30 jours sur des bouquets pourraient s'appliquer à un essai de 28 jours (ou plus) sur *M. edulis*. Même si l'essai décrit dans ASTM (2000i) est à écoulement continu, on peut procéder au renouvellement intermittent de l'eau d'essai deux ou trois fois par semaine tout au long de l'essai. Il est recommandé d'utiliser de l'eau de mer naturelle (non filtrée et non stérilisée) afin de fournir aux organismes d'essai la plus grande quantité possible d'aliments planctoniques naturels (ASTM, 2000i). Aux fins de l'exposition, la matière d'essai est mélangée uniquement à l'eau utilisée pour chaque renouvellement. Les paramètres biologiques pourraient être fondés sur la survie après 28 jours, de même que sur l'aspect des moules de chaque enceinte expérimentale, lors de l'autopsie pratiquée à la fin de l'essai, conformément aux procédures reconnues pour les bivalves (p. ex., Shuster et Eble, 1961; Elston et coll., 1987).

Parmi les autres espèces de mollusques épibenthiques recommandées dans ASTM (2000i) pour les essais en laboratoire de 28 jours avec des contaminants aquatiques, on compte des huîtres (*C. gigas*) et des pétoncles (*Pecten* spp.). Dans l'essai de 28 jours sur *M. edulis* décrit ici, on peut utiliser, à la place de cette moule, des espèces choisies d'huîtres ou de pétoncles adultes que l'on trouve communément dans les eaux côtières canadiennes pour mesurer les effets

pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur une espèce sensible d'invertébré marin épibenthique. On sait que les huîtres et les moules sont sensibles à divers pathogènes microbiens<sup>66</sup>. Il convient de vérifier la tolérance à la salinité (contrairement à *M. edulis*, les huîtres et les pétoncles ne sont pas des espèces euryhalines) et à la température (les huîtres et les pétoncles sont des espèces d'eaux chaudes, mais les adultes peuvent tolérer des eaux tempérées) des huîtres ou des pétoncles adultes si l'on envisage de procéder à l'essai de 28 jours décrit dans ASTM (2000i) plutôt que d'utiliser la méthode d'essai recommandée à la sous-section 10.2.2 pour les bouquets.

L'USEPA a publié un certain nombre de méthodes visant à mesurer à court terme, au moyen d'essais de laboratoire sur des organismes et des stades biologiques choisis, la toxicité chronique d'effluents ou d'eaux réceptrices pour des invertébrés estuariens ou marins. Ces méthodes incluent les suivantes :

- essai de 7 jours à renouvellement intermittent pour mesurer les effets sur la survie, la croissance et la fécondité (des femelles) de mysidacés (*M. bahia*), à une salinité de 20–30 ± 2 ‰ (USEPA, 2002b, section 14);
- essai de 7 jours à renouvellement intermittent pour mesurer les effets sur la survie et la croissance du mysidacé *Holmesimysis costata*, à une salinité de 34 ± 2 ‰ (USEPA, 1995, section 12);
- essai de 72 heures (sans renouvellement) pour mesurer les effets sur des embryons en développement de l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus* ou du clypéastre *Dendraster excentricus*, à une salinité de 34 ± 2 ‰ (USEPA, 1995, section 15);
- essai de 48 heures sans renouvellement pour mesurer les effets sur des embryons en développement et des larves de l'huître *C. gigas* ou des moules *Mytilus* spp., à une salinité de 30 ± 2 ‰ (USEPA, 1995, section 13);
- essai de 48 heures à renouvellement intermittent pour mesurer les effets sur le développement de

<sup>65</sup> Pour une description des maladies et pathogènes connus des mollusques, dont les moules, voir le site suivant de Pêches et Océans Canada : [http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/toc\\_f.htm](http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/toc_f.htm).

<sup>66</sup> Pour une description des maladies et pathogènes connus des mollusques, dont les moules et les huîtres, voir le site suivant de Pêches et Océans Canada : [http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/toc\\_f.htm](http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/sci/shelldis/toc_f.htm).

l'ormeau *Haliotis rufescens* (mollusque) au stade larvaire, à une salinité de  $34 \pm 2$  ‰ (USEPA, 1995, section 14);

- essai de 80 min à renouvellement intermittent pour mesurer les effets sur le succès de fécondation à l'aide d'œufs et de sperme de l'oursin *Arbacia punctulata*, à une salinité de  $30 \pm 2$  ‰ (USEPA, 2002b, section 15);
- essai de 40 min sans renouvellement pour mesurer les effets sur le succès de fécondation à l'aide d'œufs et de sperme soit de l'oursin *A. punctulata*, soit du clypéastre *D. excentricus*, à une salinité de  $34 \pm 2$  ‰ (USEPA, 1995, section 16)<sup>67</sup>.

Parmi ces méthodes d'essai biologique, seul l'essai de 7 jours à renouvellement intermittent sur des mysidacés convient à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes, car la durée des autres essais est trop courte (c.-à-d. 40 min à 48 h). En outre, chacune de ces méthodes (y compris celle faisant appel au mysidacé *H. costata*, mais à l'exception de l'essai de 7 jours sur le mysidacé modérément euryhalin *M. bahia*) se déroule dans des conditions de salinité élevée (c.-à-d.  $\geq 28$  ‰), ce qui ne convient pas aux conditions propres aux estuaires.

Pour évaluer les effets pathogènes et/ou toxiques de micro-organismes mésophiles, on pourrait adapter l'essai de 7 jours à renouvellement intermittent pour mesurer les effets sur la survie et la croissance (ou la survie, la croissance et la fécondité) du mysidacé modérément euryhalin *M. bahia* (USEPA, 2002b, section 14). Cet essai ne s'applique toutefois pas aux micro-organismes psychrophiles, car il doit se dérouler à une température de  $26 \pm 1$  °C (USEPA, 2002b). Pour qu'il constitue une solution de rechange acceptable à l'essai de 30 jours sur des bouquets (v. § 10.2.2), l'essai doit inclure un témoin non infectieux et un témoin sur filtrat stérile. On ne devrait pas remplacer l'essai de 30 jours sur des bouquets par un essai de 7 jours sur des mysidacés si l'on sait ou présume que les effets pathogènes et/ou toxiques de la matière d'essai ne se manifesteront pas avant au moins 7 jours.

L'ASTM a publié un guide des essais de toxicité sur le cycle biologique de mysidacés marins, dont *M. bahia* (ASTM, 2000j). Cette méthode d'essai biologique est appliquée sous forme d'essai à renouvellement continu. On utilise au départ des spécimens élevés en laboratoire, âgés de <24 h après leur sortie de la poche à couvée; l'essai se poursuit pendant au moins 7 jours après le temps médian de l'éclosion de la première couvée du témoin négatif. Les paramètres biologiques à mesurer sont les effets de la matière d'essai sur la survie, la croissance et la reproduction. Cette méthode d'essai biologique exige davantage d'efforts que l'essai de 7 jours à renouvellement intermittent sur *M. bahia*, décrit à la section 14 de USEPA (2002b). Un essai sur le cycle biologique de mysidacés marins, une fois modifié correctement, pourrait être considéré comme une solution de rechange acceptable ou préférable à celle recommandée à la sous-section 10.2.2 si les effets nocifs potentiels d'une matière d'essai soulèvent des préoccupations particulières quant à la reproduction, à la croissance et au développement d'invertébrés pélagiques ou épibenthiques du milieu estuarien ou marin.

**10.2.4.2 Essais de remplacement – invertébrés endogés.** L'ASTM a publié deux guides des essais de toxicité des sédiments sur des vers polychètes estuariens ou marins (ASTM, 2000k,l). Aucune de ces méthodes d'essai n'utilise des vers polychètes spionides que l'on trouve couramment dans les eaux côtières canadiennes (p. ex., *Polydora cornuta*). Les laboratoires qui effectuent ces essais utilisent la plupart du temps des vers de l'espèce *Neanthes arenaceodentata*. La salinité applicable au maintien de ce polychète marin *sténohalin* et aux essais est de  $\geq 28$  ‰. Un de ces guides (ASTM, 2000k) décrit les procédures et conditions d'un essai de 20–28 jours sans renouvellement dont les paramètres biologiques de mesure sont la survie et la croissance (masse sèche au terme de l'essai). L'autre (ASTM, 2000l) décrit celles applicables à un essai à renouvellement intermittent sur le cycle biologique; cet essai peut durer jusqu'à 3 mois (s'il porte sur *N. arenaceodentata*). L'essai débute avec des juvéniles et se poursuit jusqu'à la ponte des œufs; le nombre d'embryons par femelle constitue le paramètre biologique à mesurer<sup>68</sup>. L'une ou l'autre de

<sup>67</sup> Environnement Canada (1992d) a publié des méthodes d'essai semblables pour la mesure des effets sublétaux de substances d'essai sur le succès de fécondation d'échinides (oursins ou clypéastres), à une salinité de  $30 \pm 2$  ‰.

<sup>68</sup> On trouvera une description des essais sur le cycle biologique d'autres espèces de vers polychètes dans ASTM (2000k). Les choix possibles incluent l'espèce estuarienne *Capitella capitata* (essai de 5 semaines), l'espèce

ces méthodes peut être envisagée pour remplacer l'essai de 28 jours sur le mollusque estuarien endogé *M. balthica*, recommandé à la sous-section 10.2.3. Dans un tel cas, il faudra apporter des modifications semblables à celles décrites dans cette section pour les essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne. Il faut souligner que toute méthode d'essai employant des vers polychètes doit se dérouler à des températures chaudes [c.-à-d.  $23 \pm 1$  °C si l'on utilise *P. cornuta* conformément à EC (2001a), ou  $17-20$  °C si l'on utilise *N. arenaceodentata* ou une autre espèce de polychète conformément à ASTM (2000k)]. Par conséquent, les essais sur des vers polychètes estuariens ou marins, contrairement à l'essai de 28 jours sur *M. balthica*, ne conviennent qu'à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques de substances microbiennes mésophiles.

Environnement Canada (2001a) a publié un essai de 14 jours mené en laboratoire sur le ver polychète *P. cornuta* en tant que méthode d'essai normalisée pour la mesure de la toxicité chronique d'échantillons de sédiments pour une espèce d'invertébré endogé des milieux estuarien ou marin. Dans certains cas, cet essai peut être envisagé pour remplacer l'essai de 28 jours sur le mollusque endogé euryhalin *M. balthica*, recommandé à la sous-section 10.2.3. Les paramètres à mesurer sont fondés sur la survie après 14 jours, sur l'inhibition de la croissance et sur l'aspect des tissus et organes des vers qui ont survécu, lors de l'autopsie pratiquée à la fin de l'essai. Parmi les désavantages de la méthode décrite dans EC (2001a) par rapport à celle recommandée à la sous-section 10.2.3 pour les invertébrés endogés, on compte une durée plus courte (qui pourrait ne pas permettre aux effets pathogènes de se manifester), une température élevée (c.-à-d.  $23 \pm 1$  °C) ne convenant qu'aux études sur les effets nocifs de micro-organismes mésophiles (et non psychrophiles), de même que des quantités minimales et restrictives de tissus de corps entiers pour la mesure de l'infectivité.

L'USEPA (2001) a publié une méthode d'essai de 28 jours servant à mesurer la toxicité chronique d'échantillons de sédiments contaminés pour

l'amphipode estuarien *Leptocheirus plumulosus*<sup>69</sup>. L'essai se déroule à une température  $25 \pm 2$  °C et à une salinité fixe ( $\pm 2$  ‰) allant de 5 ‰ à 35 ‰. Il mérite d'être envisagé pour remplacer l'essai de 28 jours sur le mollusque endogé euryhalin *M. balthica*, recommandé à la sous-section 10.2.3, si l'on souhaite évaluer les effets pathogènes et/ou toxiques d'un micro-organisme mésophile sur une espèce d'invertébré endogé des milieux estuarien ou marin. Contrairement à la méthode d'essai applicable à *M. balthica*, l'essai sur *L. plumulosus* se déroule dans des conditions d'eau chaude et ne peut donc être appliqué qu'à des micro-organismes mésophiles. L'essai de l'USEPA (2001) sur *L. plumulosus* est à renouvellement intermittent : l'eau de mer sus-jacente au sédiment de chaque enceinte expérimentale de 1 L est renouvelée trois fois par semaine (en des journées non consécutives), et des aliments d'appoint (flocons pour poissons, disponibles sur le marché) sont fournis au même moment. Les paramètres à mesurer sont la survie, la croissance et la reproduction. Comme dans le cas de l'essai sur *M. balthica* (§10.2.3), la méthode d'essai peut être appliquée à une nouvelle substance microbienne, celle-ci étant mélangée au sédiment et/ou à l'eau de mer utilisée pour chaque renouvellement.

La section 10.1.3 décrit la méthode recommandée pour mener un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 14 jours pour l'amphipode dulcicole *H. azteca*. Étant donné que cette espèce endogée sensible peut tolérer des salinités de  $\leq 15$  ‰, on peut utiliser l'essai de 14 jours pour mesurer les effets nocifs, sur une espèce d'invertébré endogé estuarien, d'une nouvelle substance microbienne susceptible de pénétrer ou de se trouver dans un milieu estuarien, pourvu que la salinité de l'essai n'excède pas 15 ‰.

Environnement Canada a publié deux méthodes d'essai biologique servant à mesurer la toxicité aiguë d'échantillons de sédiments pour une espèce choisie d'amphipode estuarien ou marin. La première (EC, 1992e) consiste en un essai sans renouvellement au cours duquel des groupes de répétition de l'une ou l'autre des espèces suivantes d'amphipodes endogés (juvéniles ou adultes) sont exposés pendant 10 jours à un ou plus d'un échantillon de sédiment dopé ou prélevé sur le terrain : *Amphiporeia virginiana*,

---

minuscule (adultes mesurant  $\leq 5$  mm de longueur) *Ophryotrocha diadema* (essai de 4 semaines) et l'espèce minuscule (adultes mesurant  $\leq 1$  mm de longueur) *Dinophilus gyrociliatus* (essai de 10 jours).

---

<sup>69</sup> *L. plumulosus* est un amphipode endogé que l'on trouve dans les portions infratidales des estuaires saumâtres de la côte Atlantique. Il est facile à élever en laboratoire (USEPA, 2001).

*Corophium volutator*, *Eohaustorius estuarius*, *Eohaustorius washingtonianus*, *Foxiphalus xiximeus*, *Leptocheirus pinguis* ou *Rhepoxynius abronius*. Le paramètre biologique de cet essai est le pourcentage de mortalité le jour 10; le recours à des paramètres sublétaux, dont le nombre d'organismes ayant survécu à l'exposition et qui ont émergé du sédiment et/ou qui ne se sont pas enfouis de nouveau dans le sédiment témoin négatif à la fin de l'essai, est facultatif. La deuxième (EC, 1998a) est une *méthode de référence* connexe pour la détermination de la létalité aiguë d'échantillons de sédiments pour des amphipodes marins ou estuariens (*A. virginiana*, *E. estuarius*, *E. washingtonianus* ou *R. abronius*) au cours d'un essai de 10 jours sans renouvellement. La méthode d'essai biologique décrite dans EC (1992e), que l'on peut appliquer sous forme d'essai à concentration unique ou d'essai à concentrations multiples dans lesquels la matière d'essai est mélangée au sédiment, peut être modifiée et appliquée pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité aiguës (létales et/ou sublétales) de nouvelles

substances microbiennes; ces modifications seront modelées sur celles résumées au tableau 7 en regard de la méthode d'essai biologique recommandée pour le mollusque endogé *M. balthica*. Parmi ces modifications ou adaptations, on compte le renouvellement intermittent de l'eau sus-jacente et le mélange de la matière d'essai à sa CDM dans cette eau et dans le sédiment s'il s'agit d'un essai à concentration unique; dans le cas d'un essai à concentrations multiples, la matière d'essai à des concentrations plus faibles est mélangée soit à l'eau sus-jacente, soit au sédiment (v. § 10.2.3). Même si les essais décrits dans EC (1992e, 1998a) se déroulent le plus souvent à une température de  $15 \pm 2$  °C, on peut procéder à un essai de toxicité aiguë pour des amphipodes marins ou estuariens à des températures plus élevées (micro-organismes mésophiles) ou plus fraîches (micro-organismes psychrophiles), pourvu que les amphipodes soient acclimatés et maintenus aux températures prévues pour l'essai pendant la période d'acclimatation qui le précède.

## Essais sur des vertébrés aquatiques

### 11.1 Poissons d'eau douce

#### Repères

- *L'essai biologique normalisé que l'on recommande d'utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des poissons d'eau douce consiste en un essai de 28 jours visant à évaluer la survie, la croissance, l'aspect et le comportement de poissons d'eau douce juvéniles acclimatés; il s'agit d'une version modifiée de celui décrit dans OCDE (2000b) et il est conforme dans l'ensemble à celui que prescrit l'USEPA (1996g). Pour les micro-organismes psychrophiles, on recommande d'utiliser des truites arc-en-ciel maintenues à une température choisie à l'intérieur de la plage de 5–16 °C. Pour les micro-organismes mésophiles, on recommande d'utiliser des crapets arlequins maintenus à une température se situant entre 17 °C et 25 °C. Cette méthode d'essai biologique prévoit l'autopsie des poissons à la fin de l'essai en vue de détecter les changements macroscopiques dans les tissus ou les organes et, le cas échéant, les effets histologiques.*
- *Il existe des méthodes de remplacement (normalisées), notamment un essai sur les premiers stades biologiques de la truite arc-en-ciel (embryons et alevins) (EC, 1998b) au cours duquel on évalue les effets d'un micro-organisme psychrophile sur une espèce de poisson d'eau douce, de même qu'un essai de 7 jours permettant de mesurer les effets d'un micro-organisme mésophile sur la survie et la croissance de têtes-de-boule. Ces méthodes peuvent s'appliquer dans certains cas. Dans l'essai de 28 jours recommandé ici pour les micro-organismes psychrophiles, on pourrait remplacer la truite arc-en-ciel par une espèce de saumon d'eau douce.*

#### 11.1.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens

Douville (2001) a passé en revue les études de recherche sur les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes ou de produits microbiens donnés sur diverses espèces de poissons d'eau douce dans des conditions de laboratoire contrôlées. Ces études ont souvent fait appel à la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et à d'autres espèces de salmonidés acclimatés à l'eau douce. Les essais sur des salmonidés ont montré que ceux-ci étaient sensibles aux divers pathogènes (bactéries,

virus, champignons et protozoaires) auxquels ils étaient exposés, notamment par contact direct dans l'eau, par voie orale (aliments infectés) ou par gavage (Douville, 2001). Les paramètres biologiques à mesurer au cours des essais sur des salmonidés ou d'autres espèces de poissons exposés à ces pathogènes incluent la mortalité aiguë et chronique, l'inhibition de la croissance, des changements d'ordre hématologique et biochimique (indices de stress ou de maladie), de même que des symptômes macroscopiques et microscopiques de pathologie relevés au cours de l'autopsie des poissons exposés.

Dans le cadre de ses lignes directrices de la série 885 sur les pesticides microbiens, l'USEPA a publié une méthode d'essai de 30 jours visant à mesurer les effets de ces pesticides sur la survie et le bien-être apparent de poissons d'eau douce (USEPA, 1996g). Pour cet essai, l'agence recommande d'utiliser des truites arc-en-ciel au stade de l'*alevin nageant* ou du *fingerling*. Les paramètres biologiques incluent la survie au bout de 30 jours, de même que des observations relatives à l'infectivité et aux symptômes de pathogénicité.

Aux États-Unis, des laboratoires privés menant des essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'agents ou de produits microbiens sur des poissons ont mis au point, à l'interne, des modes opératoires normalisés applicables à des essais de 30 jours sur la truite arc-en-ciel; ces modes opératoires sont conformes aux lignes directrices de l'USEPA (1996g). Les trois laboratoires qui ont répondu au questionnaire non officiel de 2002 (v. § 8.8) ont indiqué avoir mené 28 essais avec des AAM ou des produits microbiens. Vingt-deux de ces essais portaient sur des bactéries, 3 sur des virus et 3 sur des champignons, et plus de la moitié (57 %) consistaient en essais à concentrations multiples. Environ le tiers des 28 essais ont mis en lumière les effets pathogènes et/ou toxiques de ces substances sur la truite arc-en-ciel. Des témoins non infectieux et des témoins sur filtrat stérile étaient inclus dans 57 % et dans 32 % des essais, respectivement, tandis que l'infectivité a été mesurée au cours ou à la fin de l'essai dans seulement 7 % des cas. Aucun des 28 essais n'incluait de témoin microbien positif ou de témoin chimique positif.

Dans sa réponse au questionnaire de 2002 (v. § 8.8), la division des pesticides microbiens de l'USEPA signale l'existence d'une base de données sur ~87 essais de 30 jours menés sur la truite arc-en-ciel ou le crapet arlequin (*Lepomis macrochirus*) exposés à des AAM ou à leur PC. Des 87 substances microbiennes mises à l'essai sur des poissons d'eau douce, ~60 étaient des bactéries, 6 des virus, ~20 des champignons et le dernier un protozoaire. Il s'agissait dans chaque cas d'essais à concentration unique visant à mesurer les effets nocifs de ces AAM sur des poissons d'eau douce. Peu d'essais (<3 %) comportaient un témoin sur filtrat stérile ou un témoin non infectieux; aucun ne prévoyait de témoin microbien positif ou de témoin chimique positif, tandis que <3 % incluaient des mesures de l'infectivité. La teneur en micro-organismes de l'eau d'essai à laquelle les poissons étaient exposés a été mesurée dans environ la moitié des essais.

#### 11.1.2 Méthode d'essai biologique recommandée

Il est recommandé d'utiliser un essai de pathogénicité et/ou de toxicité pour des poissons juvéniles acclimatés à l'eau douce, étalé sur 28 jours (ou plus), pour mesurer les effets écologiques potentiellement nocifs d'une nouvelle substance microbienne sur une espèce et un stade biologique choisis de poisson. La méthode décrite ici est une adaptation de l'essai sur la croissance de poissons juvéniles publié par l'OCDE (2000b); elle inclut des paramètres associés au comportement et à l'aspect (y compris au moment de l'autopsie pratiquée à la fin de l'essai) des poissons de chaque traitement. Elle est conforme à USEPA (1996g), de même qu'à certaines procédures et conditions de l'essai de 28 jours décrit dans ASTM (2000i).

Il est recommandé d'utiliser des truites arc-en-ciel juvéniles (moins d'un an) pour les essais visant à mesurer les effets d'un micro-organisme psychrophile sur une espèce de poisson d'eau douce (USEPA, 1996g; OCDE, 2000b). La température d'essai devrait se situer à l'intérieur de la plage de 5–16 °C. Pour les essais visant à mesurer les effets d'un micro-organisme mésophile sur une espèce de poisson d'eau douce (USEPA, 1996g; ASTM, 2000i), on recommande d'utiliser des crapets arlequins juvéniles. La température d'essai devrait se situer à l'intérieur de la plage de 17–25 °C. Dans chaque cas, les organismes d'essai devraient être acclimatés graduellement ( $\leq 3$  °C/jour) à la température choisie; une fois celle-ci atteinte, l'acclimatation doit se

poursuivre pendant au moins deux semaines avant la mise en route de l'essai.

Le tableau 8 résume les procédures et conditions applicables à un essai de 28 jours sur des truites arc-en-ciel ou des crapets arlequins juvéniles acclimatés à l'eau douce. D'autres publications d'Environnement Canada renferment des indications supplémentaires relatives aux essais menés en laboratoire sur des truites arc-en-ciel. Ainsi, EC (1990b) décrit en détail les procédures et conditions applicables au maintien et à l'acclimatation des alevins (moins d'un an) de truites arc-en-ciel en vue des essais de létalité aiguë; le document renferme aussi des indications sur les organismes d'essai, les installations d'essai (et les appareils) appropriées et les procédures propres aux essais universels (ou aux essais avec des produits chimiques) qui conviennent également aux fins présentes. On trouve dans EC (2000b) une *méthode de référence* servant à déterminer la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel. Environnement Canada a aussi publié deux éditions de sa méthode d'essai biologique applicable aux essais de toxicité pour les premiers stades biologiques de la truite arc-en-ciel (EC, 1992g, 1998b). Il est conseillé de consulter l'annexe X6 de ASTM (2000m), qui porte sur l'élevage de crapets arlequins et sur les essais faisant appel à cette espèce, et de se conformer aux indications qu'elle renferme au moment des essais.

Comme il est indiqué au tableau 8, l'essai de 28 jours exige le renouvellement intermittent de chaque concentration expérimentale tout au long de l'essai; ce renouvellement a lieu trois fois par semaine, en des journées non consécutives (p. ex., tous les lundis, mercredis et vendredis). La durée de l'acclimatation et les conditions et procédures propres aux essais sont aussi indiquées dans ce tableau. Chaque essai doit comporter un témoin négatif (v. § 4.1). En outre, il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux (§ 4.4), tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile (§ 4.5) est facultatif. La mesure de l'infectivité à partir d'un ou de plusieurs organes (p. ex., foie, rein, cerveau ou muscles), tissus ou liquides organiques (p. ex., sang ou urine), ou encore à partir d'un homogénat de corps entiers<sup>70</sup> est

<sup>70</sup> Si l'on souhaite obtenir des renseignements sur l'infectivité en fonction du temps, on peut ajouter des répétitions à cette seule fin (p. ex., pour l'échantillonnage hebdomadaire et les analyses subséquentes portant sur la présence ou l'absence du micro-organisme d'essai dans les tissus et organes des poissons).

**Tableau 8 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 28 jours sur des poissons juvéniles acclimatés à l'eau douce**

**Essai universel**

Méthode d'essai	— Adaptée de OCDE (2000b), <i>Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques — Poisson, essai sur la croissance des juvéniles</i> ; indications supplémentaires tirées de USEPA (1996g) et de ASTM (2000i).
Type d'essai	— Renouvellement intermittent de chaque concentration expérimentale (y compris des témoins) tout au long de l'essai de 28 jours (ou plus), trois fois par semaine en des journées non consécutives (p. ex., tous les lundis, mercredis et vendredis).
Poissons d'essai	— Juvéniles en phase de croissance exponentielle, provenant tous de la même population; la longueur du plus gros poisson ne doit pas être plus de deux fois supérieure à celle du plus petit; l'écart entre le poids frais individuel et le poids frais moyen ne devrait pas être supérieur à 10 %, l'écart maximal devant être de 25 %; espèces recommandées : truite arc-en-ciel ( <i>O. mykiss</i> ) pour les essais en eau tempérée avec des substances microbiennes psychrophiles, et crapet arlequin ( <i>L. macrochirus</i> ) pour les essais en eau chaude avec des micro-organismes mésophiles.
Température de l'eau	— Plages acceptables : 5–16 °C pour la truite et 17–25 °C pour le crapet; température ne s'écartant pas de plus de 2 °C de la moyenne, tout au long de l'essai.
Éclairage	— En spectre continu, 100–500 lux à la surface de l'eau; normalement, 16 ± 1 h de clarté et 8 ± 1 h d'obscurité; de préférence, transition graduelle entre clarté et obscurité et vice versa.
pH	— Aucun rajustement si le pH de la ou des concentrations expérimentales se situe entre 6,5 et 8,5; deuxième essai recommandé (pH rajusté) si le pH d'un traitement se situe en dehors de cette plage.
Oxygène dissous	— ≥60 % de la valeur de saturation dans chaque enceinte expérimentale, tout au long de l'essai; aération modérée dans toutes les enceintes au besoin seulement.
Acclimatation	— Acclimatation aux conditions de l'essai pendant au moins deux semaines (c.-à-d. à la température, à la photopériode et à l'eau témoin/de dilution choisies pour l'essai).
Eau témoin/de dilution	— Eau douce naturelle ou artificielle; teneur en OD de 90–100 % de la valeur de saturation lorsque l'eau est versée dans les enceintes expérimentales.
Témoins	— Chaque essai doit inclure un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de poissons par enceinte expérimentale	— 10
Profondeur et densité de chargement	— ≥15 cm dans chaque enceinte expérimentale; densité de chargement de ≤0,5 g/L.
Alimentation	— Au moins une fois par jour tout au long de l'essai, sous forme de boulettes d'aliments pour poissons du commerce; ration quotidienne correspondant à 4 % du poids frais; aucune alimentation pendant les 24 h précédant la pesée.
Modes d'exposition	— Matière d'essai mélangée à l'eau douce et aux aliments pour un essai à concentration unique; matière d'essai mélangée soit à l'eau douce, soit aux aliments pour un essai à concentrations multiples.
CDM pour l'eau	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : 10 <sup>6</sup> unités microbiennes/mL d'eau, ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aqueux (v. § 3.3.1.1).
CDM pour les aliments	— 100 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aquatique (v. § 3.3.1.3).
Essai d'infectivité	— Facultatif – la décision à cet égard se fonde sur la teneur mesurée en micro-organismes d'un ou de plusieurs tissus, organes ou fluides organiques (p. ex., sang ou urine), ou encore d'un homogénat de corps entiers de poissons de chaque traitement, au cours et/ou au terme de l'essai.



Mesures	—	Mesure de la température, du pH et de l'OD au début et à la fin de chaque renouvellement, pour au moins une répétition de chaque traitement; poids frais de chaque poisson de chaque enceinte expérimentale au début et à la fin de l'essai (et, facultativement, le jour 14); chaque semaine, si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai ainsi qu'au début et à la fin d'au moins un cycle de renouvellement.
Observations	—	Tous les jours jusqu'à la fin de l'essai, observation de la survie, de l'aspect et du comportement des poissons dans chaque enceinte expérimentale; autopsie de chaque spécimen mort pendant l'essai et au terme de celui-ci, pour évaluer toute anomalie macroscopique externe et interne; histologie de tissus et d'organes choisis, le cas échéant.
Paramètres biologiques	—	Survie, croissance (moyenne $\pm$ ET du poids frais de poissons individuels), aspect (y compris au moment de l'autopsie pratiquée à la fin de l'essai) et comportement des spécimens de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au cours et au terme de l'essai.
Validité de l'essai	—	Essai invalide si la survie est de $<80$ % dans le groupe témoin négatif à la fin de l'essai.

### ***Essai à concentration unique***

Nombre de traitements	—	Au moins deux (CDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	—	Trois par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre de poissons par traitement	—	30
Modes d'exposition	—	Matière d'essai à sa CDM mélangée à l'eau douce et aux aliments.
Paramètres statistiques	—	Pourcentage de survie des poissons de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au terme de l'essai; poids frais moyen ( $\pm$ ET) de chaque poisson ayant survécu, pour chaque enceinte expérimentale et chaque traitement, à la fin de l'essai; pourcentage de poissons ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont les organes et/ou les tissus ont un aspect atypique à la fin de l'essai.
Comparaisons statistiques	—	CDM et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie, dans le poids frais, à la fin de l'essai, de chaque poisson ayant survécu et dans le pourcentage de poissons ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

Nombre de concentrations (ou nombre de traitements)	—	Au moins cinq, dont la CDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de répétitions	—	Une par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre de poissons par traitement	—	10
Mode d'exposition	—	Matière d'essai mélangée à l'eau douce ou aux aliments (un mode d'exposition par essai).
Paramètres statistiques	—	Pourcentage de survie des poissons de chaque traitement, au terme de l'essai; poids frais moyen ( $\pm$ ET) des poissons ayant survécu, pour chaque traitement, à la fin de l'essai; pourcentage de poissons de chaque traitement dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique à la fin de l'essai; si les données le permettent, $CL_{50}$ 28 jours et $CI_{25}$ 28 jours en regard du poids frais des poissons ayant survécu, $CE_{50}$ 28 jours d'après le pourcentage de poissons ayant survécu dans chaque traitement et présentant un aspect et/ou un comportement atypiques; CSEO/CMEO.
Comparaisons statistiques	—	Concentrations expérimentales et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie, dans le pourcentage d'organes et/ou de tissus d'aspect atypique, dans le pourcentage de poissons ayant un comportement anormal et dans le poids frais moyen des poissons ayant survécu, à la fin de l'essai; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

---

également facultative et dépend des objectifs de l'étude (v. section 5).

Les spécifications propres aux essais à concentration unique (§ 3.3.1) ou à concentrations multiples (§ 3.3.2) sont résumées au tableau 8. On peut avoir recours à deux modes simultanés d'exposition des poissons à la matière d'essai en mélangeant celle-ci à l'eau et aux aliments lors d'un essai à concentration unique. Si l'on procède à un essai à concentrations multiples, on devrait mesurer séparément les effets de la matière d'essai selon chacun de ces modes d'exposition (v. § 3.2). Il convient de se conformer aux indications fournies aux sous-sections 3.4.1 (eau) et 3.4.4 (aliments) lors du mélange de la matière d'essai à l'eau ou aux aliments.

Les poissons juvéniles doivent être dans leur phase de croissance exponentielle lorsqu'ils sont transférés dans les enceintes expérimentales. Leur taille doit être semblable : la longueur du plus gros ne doit pas être plus de deux fois supérieure à celle du plus petit. En outre, l'écart entre le poids frais individuel et le poids frais moyen de tous les poissons utilisés dans l'étude ne devrait pas être supérieur à 10 %, l'écart maximal devant être de 25 % (OCDE, 2000b). Au début de l'essai, il faut déterminer et consigner la masse de chaque poisson transféré dans chaque enceinte expérimentale. La ration alimentaire fournie à ce moment-là devrait équivaloir à ~4 % de la masse moyenne de tous les poissons utilisés dans l'étude (OCDE, 2000b). Si l'on procède à une nouvelle pesée le jour 14, la ration doit être recalculée (OCDE, 2000b)<sup>71</sup>. À la fin de l'essai, il faut déterminer et consigner encore une fois le poids frais de chaque poisson ayant survécu. Les poissons ne devraient pas être nourris pendant les 24 h précédant chaque pesée.

Les paramètres biologiques sont fondés sur la survie et la croissance (c.-à-d. le poids frais de chaque poisson de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement) après 28 jours, de même que sur l'aspect et le comportement des poissons de chaque enceinte expérimentale pendant l'essai et au terme de celui-ci. L'annexe E de EC (1990b) décrit le type

d'observations [aspect et comportement des alevins (moins d'un an) de truites arc-en-ciel] qui s'appliquent aux fins présentes et qui doivent être effectuées quotidiennement pour chaque groupe de poissons (qu'il s'agisse de truites arc-en-ciel ou de crapets arlequins) de chaque enceinte expérimentale. Au cours de ces observations, tout poisson mort doit être enlevé de l'enceinte, et ses tissus et organes externes et (après dissection) internes (p. ex., épithélium, yeux, branchies, nageoires, cavité péritonéale, vessie gazeuse, foie, rate, accumulations adipeuses, rein et région antérieure du rein) doivent faire l'objet d'un examen macroscopique détaillé. Le jour 28, chacun des poissons encore vivants de chaque traitement (et du traitement témoin négatif) doit être tué, pesé, puis soumis au même type d'examen macroscopique (autopsie). Le ou les responsables des essais devraient bien connaître les procédures d'autopsie acceptées et normalisées applicables aux poissons (p. ex., Fisher et Myers, 2000); ces procédures devraient être observées lors de chaque autopsie. Si des signes de pathologie sont évidents, il faudrait disséquer le ou les tissus et organes touchés, les préserver et les conserver à part en vue d'un examen microscopique ultérieur, le cas échéant.

Dans le cas d'un essai à concentration unique, les paramètres statistiques à mesurer, au terme de l'essai de 28 jours, en regard des poissons de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement incluent les suivants :

- 1) pourcentage de survie des poissons;
- 2) pourcentage de poissons présentant un comportement atypique (p. ex., poissons faisant surface, nage irrégulière, perte d'équilibre);
- 3) pourcentage de poissons dont un ou plusieurs organes ou tissus sont d'apparence anormale (p. ex., lésions de l'épithélium ou d'autres tissus, œil opaque ou présentant des signes d'hémorragie, décoloration ou autre aspect atypique du foie);
- 4) poids frais moyen ( $\pm$  ET) de chaque poisson ayant survécu.

Une fois établies pour la CDM et pour tout traitement témoin autre que le négatif, les valeurs respectives de ces paramètres devraient être comparées à celles établies pour le témoin négatif, à l'aide d'un test

<sup>71</sup> Comme solution de rechange, on peut ajouter à chaque essai des répétitions du témoin négatif aux seules fins de surveiller les gains de poids (p. ex., toutes les semaines) et de rajuster les rations en conséquence. Il faudrait aussi rajuster la ration quotidienne (~4 % de la masse corporelle) en fonction de la mortalité des poissons de chaque enceinte expérimentale.

statistique permettant des comparaisons par paire, comme le *test de Student*. Il convient de consulter les méthodes statistiques que renferme le guide des essais d'écotoxicité d'Environnement Canada (EC, 2004d) pour déterminer les paramètres à mesurer ainsi que pour choisir les méthodes à appliquer.

Ces mêmes paramètres s'appliquent dans le cas d'un essai à concentrations multiples. Si les données le permettent (v. § 3.3.2), la  $CL_{50}$  28 jours de la matière d'essai devrait être établie, de même que la pente de sa courbe et ses limites de confiance de 95 %. La  $CI_{25}$  28 jours de la croissance devrait être calculée d'après le poids frais moyen ( $\pm$  ET) des poissons de chaque traitement (y compris du témoin négatif) si l'on dispose de suffisamment de données. Dans la mesure du possible, on devrait aussi calculer la  $CE_{50}$  28 jours d'après l'aspect et/ou le comportement atypiques de chaque poisson de chaque traitement, ainsi que la pente de sa courbe et ses limites de confiance de 95 %. Toujours si les données le permettent, il faudrait calculer et déclarer la CSEO et la CMEO en regard des paramètres de mesure (c.-à-d. la survie et la croissance après 28 jours, de même que les valeurs attribuées à l'aspect et/ou au comportement atypiques des poissons). EC (2004d) renferme des conseils sur les logiciels (et leur application) à utiliser pour déterminer la  $CL_{50}$ , la  $CI_{25}$  ou la  $CE_{50}$  ou pour calculer la CMEO et la CSEO. En outre, on devrait consulter ce document lors du choix des méthodes statistiques applicables aux données tirées de l'étude sur l'aspect (y compris celui observé lors des autopsies) et le comportement des poissons.

### 11.1.3 Autres méthodes ou procédures

Spacie (1992) a passé en revue les méthodes et procédures applicables à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques d'agents microbiens sur diverses espèces de poissons et de crustacés d'eau douce, d'eau d'estuaire ou d'eau de mer. Son rapport renferme des recommandations utiles quant aux espèces à utiliser (y compris la truite arc-en-ciel), aux plans d'expérience, aux modes d'exposition, à la durée des essais et aux analyses statistiques.

L'essai de 28 jours recommandé ici (v. § 11.1.2) pourrait porter sur des saumons (alevins nageants ou fingerlings). Par exemple, le saumon coho (*O. kisutch*), le saumon quinnat (*O. tshawytscha*), le saumon rouge (*O. nerka*) ou le saumon atlantique (*Salmo salar*) peuvent servir d'organismes d'essai; les procédures et conditions résumées au tableau 8 pour

la truite arc-en-ciel sont les mêmes dans le cas de ces espèces. On pourrait d'ailleurs privilégier ces espèces (plutôt que la truite arc-en-ciel) si l'application prévue de la nouvelle substance microbienne risque d'avoir des effets nocifs et préoccupants sur leurs alevins en eau douce. Toutefois, les résultats des essais de 28 jours sur des truites arc-en-ciel constituent des données de remplacement adéquates à cet égard; dans l'ensemble, ces essais devraient convenir à la mesure des effets nocifs potentiels d'une nouvelle substance microbienne donnée pour la plupart des espèces de saumons ou de truites vivant en eau douce.

La méthode d'essai biologique normalisée décrite dans EC (1998b), qui permet de mesurer la toxicité de produits chimiques, d'effluents ou d'eaux réceptrices pour la truite arc-en-ciel aux premiers stades de son cycle biologique, pourrait être appliquée à des micro-organismes psychrophiles. Chacune des possibilités suivantes peut être envisagée :

- a) essai de 7 jours sur des embryons (*essai E*) – l'exposition à la matière d'essai débute dès la fécondation et se termine 7 jours plus tard;
- b) essai sur des embryons et des alevins (*essai EA*) – l'exposition débute dès la fécondation et se poursuit jusqu'à ce que les alevins aient absorbé le contenu de leur vésicule vitelline et soient devenus des alevins nageants;
- c) essai sur des embryons/alevins/truitelles (*essai EAT*) – la mesure des effets de l'exposition débute dès la fécondation et se poursuit pendant les 30 premiers jours au cours desquels les alevins nageants s'alimentent activement.

On pourrait envisager l'application de l'un des essais susmentionnés si l'on se préoccupe particulièrement des effets nocifs d'un micro-organisme psychrophile sur des embryons ou des alevins de truites arc-en-ciel. Dans de nombreux cas, l'essai E sera sans doute trop court pour se prêter à l'étude d'effets pathogènes potentiels. C'est pourquoi des essais comportant une exposition plus longue après la fécondation (c.-à-d. les essais EA et EAT) conviendraient davantage à cette fin.

Environnement Canada et l'USEPA ont tous deux publié une méthode d'essai biologique portant sur la croissance et la survie des larves de têtes-de-boule (*Pimephales promelas*) (EC, 1992f; USEPA, 2002a).

Cette méthode a souvent été appliquée à la mesure et à la surveillance de la toxicité d'effluents, d'eaux réceptrices et de produits chimiques. Il s'agit d'un essai de 7 jours à renouvellement intermittent où le retard de croissance fait partie des effets sublétaux à mesurer. Il n'a pas été appliqué souvent aux essais de pathogénicité et/ou de toxicité de micro-organismes, mais il pourrait s'avérer utile. La brièveté de l'exposition constitue une lacune sur le plan de la mesure des effets pathogènes, comparativement à un essai de 28 jours sur des crapets arlequins (v. § 11.1.2). Cependant, on pourrait envisager de recourir à cette méthode d'essai, qui se déroule à une température de  $25 \pm 1$  °C (EC, 1992f), comme solution de rechange à l'essai de 28 jours sur le crapet arlequin si la nouvelle substance microbienne est mésophile et si l'on sait ou présume qu'elle aura des effets pathogènes et/ou toxiques sur des poissons à l'intérieur d'une période relativement courte (p. ex., 7 jours).

## 11.2 Poissons d'estuaire ou d'eau de mer

### Repères

- *L'essai biologique normalisé que l'on recommande d'utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des poissons d'eau d'estuaire ou d'eau de mer consiste en un essai de 28 jours sur la survie, la croissance, l'aspect et le comportement de poissons juvéniles acclimatés à l'eau de mer. Pour les micro-organismes psychrophiles, on recommande d'utiliser la truite arc-en-ciel, le saumon rose ou le saumon kéta acclimatés à l'eau de mer et maintenus à une température choisie à l'intérieur de la plage de 5–16 °C. Pour les micro-organismes mésophiles, on recommande d'utiliser la capucette Menidia beryllina, la capucette barrée, l'épinoche à trois épines ou le méné tête-de-mouton maintenus à une température se situant entre de 17 °C et 25 °C. La méthode d'essai biologique décrite ici est une adaptation (pour des poissons acclimatés à l'eau de mer) de celle décrite dans OCDE (2000b) et englobe des directives tirées de USEPA (1996g) et de ASTM (2000i). Elle prévoit l'autopsie des poissons à la fin de l'essai en vue de détecter les changements macroscopiques dans les tissus ou les organes et, le cas échéant, les effets histologiques.*
- *Les salinités à appliquer sont fonction de l'espèce. On recommande d'utiliser les plages suivantes pour les essais : truite arc-en-ciel,  $\leq 14$  ‰; saumon rose ou saumon kéta, 10–32 ‰; M. beryllina, capucette barrée et épinoche à trois épines, 5–32 ‰; méné tête-de-mouton, 20–32 ‰. Tout au long d'un même*

*essai, la salinité ne devrait pas s'écarter de plus de 2 ‰ de la moyenne.*

- *L'USEPA (1995, 2002b) a publié quatre méthodes à court terme servant à mesurer les effets chroniques de contaminants aquatiques sur des poissons acclimatés à l'eau de mer; l'une ou l'autre de ces méthodes pourrait remplacer l'essai de 28 jours recommandé ici. Il convient cependant de faire preuve de prudence dans l'application de ces méthodes, car elles sont de courte durée (7 jours, le plus souvent).*

### 11.2.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens

De nombreux chercheurs ont étudié les effets pathogènes et/ou toxiques de bactéries, virus ou autres micro-organismes sur des salmonidés ou d'autres espèces de poissons de mer. Douville (2001) a passé en revue certains travaux de ces chercheurs, notamment l'information sur le type de micro-organisme utilisé (bactérie, virus, protozoaire et champignon), le mode d'exposition et la nature des effets observés. Bon nombre de ces travaux ont porté sur diverses espèces de salmonidés maintenus dans l'eau de mer pendant leur exposition à un pathogène donné. On trouve dans la documentation scientifique beaucoup d'exemples d'études de laboratoire faisant état des effets de pathogènes particuliers sur la survie, le comportement, la chimie du sang, la physiologie ou l'aspect (y compris les effets sur l'histologie) d'autres espèces de poissons (p. ex., *Menidia beryllina*, flétan, morue, sole anglaise, bar commun, turbot) maintenus dans de l'eau d'estuaire ou dans de l'eau de mer à la concentration maximale. Les rapports publiés qui décrivent les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des poissons en eau de mer sont toutefois moins courants (Douville, 2001).

Dans sa réponse au questionnaire de 2002 relatif aux essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'AAM ou de produits microbiens (v. § 8.8), la division des pesticides microbiens de l'USEPA a indiqué qu'elle ne possédait aucune donnée sur les essais employant comme organismes d'essai des poissons en eau de mer. Les trois laboratoires privés des États-Unis qui ont également répondu au questionnaire ont mentionné l'existence de seulement six études au cours desquelles des ménés tête-de-mouton (*Cyprinodon variegatus*) acclimatés à l'eau de mer ont été exposés à des produits antiparasitaires

bactériens. Aucun de ces essais, menés à la CDM uniquement, n'a permis de relever des effets pathogènes et/ou toxiques. Aucun ne comportait de témoin microbien positif ou de témoin chimique positif, et un seul incluait un témoin sur filtrat stérile ainsi qu'un témoin non infectieux. Au cours de chacun des six essais, on a mesuré la concentration bactérienne à laquelle les ménés tête-de-mouton acclimatés à l'eau de mer étaient exposés. Les essais comportaient en outre la mesure de l'infectivité chez les poissons exposés.

### 11.2.2 Méthode d'essai biologique recommandée

Il est recommandé d'utiliser un essai de 28 jours sur une espèce choisie de poisson (stade juvénile) acclimaté à l'eau saumâtre ou à l'eau de mer à sa concentration maximale pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques potentiels d'une nouvelle substance microbienne. La méthode d'essai biologique décrite ici est une adaptation de celle prescrite par l'OCDE (2000b) et englobe des directives supplémentaires tirées de USEPA (1996g) et de ASTM (2000i). Elle est très semblable à celle présentée à la sous-section 11.1.2 pour des poissons juvéniles acclimatés à l'eau douce. Les paramètres ultimes sont la survie et la croissance de poissons juvéniles pendant les 28 jours de l'essai, de même que leur comportement et leur aspect (y compris celui déterminé au cours de l'autopsie). Le tableau 9 résume les procédures et conditions applicables à cet essai.

On recommande d'utiliser des truites arc-en-ciel (*O. mykiss*), des saumons kétas (*O. keta*) ou des saumons roses (*O. gorbuscha*) acclimatés à l'eau de mer<sup>72</sup> pour les essais visant à mesurer les effets d'une

<sup>72</sup> L'utilisation d'espèces et de stades biologiques appropriés de salmonidés acclimatés à l'eau de mer est tout indiquée pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité d'un micro-organisme psychrophile au cours d'un essai de 28 jours, et ce, pour plusieurs raisons. Comme dans le cas des truites arc-en-ciel âgées de moins d'un an employées pour les essais en eau douce, l'utilisation du saumon kéta ou du saumon rose est justifiée à de nombreux égards : (i) la valeur récréative et/ou commerciale de ces espèces; (ii) leur sensibilité connue à divers pathogènes microbiens dans l'eau de mer; (iii) leur sensibilité aux produits chimiques toxiques présents dans l'eau de mer et dans l'eau douce; (iv) l'utilisation généralisée de ces espèces et d'autres salmonidés dans les études de laboratoire sur les effets écologiques de diverses substances; (v) l'information disponible sur le taux de croissance des juvéniles de ces espèces et d'autres salmonidés en eau de mer; (vi) la masse de renseignements accumulés sur leur anatomie macroscopique et microscopique; (vii) des connaissances

substance microbienne psychrophile sur des poissons juvéniles en eau de mer; les essais doivent se dérouler à une température se situant entre 5 °C et 16 °C (v. tableau 9). Les truites arc-en-ciel juvéniles conviennent à des salinités de  $\leq 14$  ‰, tandis que les saumons kétas ou les saumons roses juvéniles peuvent être utilisés si la plage de salinité est de 10–32 ‰. Si l'on se sert de truites arc-en-ciel, les fingerlings pesant entre 1 g et 5 g chacun devront être acclimatés graduellement (p. ex., augmentation de  $\leq 3$  ‰/jour) à une eau de mer dont la salinité est de  $\leq 14$  ‰; une fois celle-ci atteinte, l'acclimatation doit se poursuivre pendant au moins deux semaines avant les essais<sup>73</sup>. Dans le cas du saumon kéta ou du saumon rose, l'acclimatation des alevins nageants ou des fingerlings pesant entre 0,5 g et 5 g se fera graduellement à une salinité choisie ( $\pm 2$  ‰) se situant entre 10 ‰ et 32 ‰; comme dans le cas de la truite arc-en-ciel, l'acclimatation doit se poursuivre pendant au moins deux semaines avant les essais. On considère que ces deux espèces conviennent à des essais de 28 jours sur des poissons acclimatés à l'eau de mer et exposés à un micro-organisme psychrophile, étant donné que les saumons migrent naturellement vers la mer peu après avoir commencé à s'alimenter. Il n'est pas recommandé d'utiliser pour cet essai le saumon atlantique, le saumon coho, le saumon quinnat ou le saumon rouge, par exemple, car les poissons de ces espèces séjournent normalement pendant une année ou plus en eau douce avant leur smoltification (adaptation physiologique en vue du passage de l'eau douce à l'eau de mer) et leur migration vers la mer. On se servira préférablement de poissons de petite taille afin de réduire au minimum le volume d'eau dont on a besoin pour respecter la densité maximale de chargement dans chaque enceinte expérimentale (v. tableau 9). Il est donc recommandé d'employer des alevins (moins d'un an) de truites arc-en-ciel, de saumons kétas ou de saumons roses, acclimatés à une température et à une salinité se situant à l'intérieur de leur plage de tolérance (v. tableau 9).

Pour les essais visant à mesurer les effets d'un micro-organisme mésophile sur des poissons juvéniles en eau de mer, on peut faire appel à l'une ou l'autre des

adéquates sur leur élevage et leur comportement dans des conditions de laboratoire.

<sup>73</sup> Les jeunes fingerlings s'adaptent facilement à une salinité pouvant atteindre jusqu'à 14 ‰; des valeurs supérieures peuvent occasionner un stress ou s'avérer intolérables.

**Tableau 9 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 28 jours sur des poissons juvéniles acclimatés à l'eau de mer**

*Essai universel*

Méthode d'essai	— Adaptée de OCDE (2000b), <i>Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques — Poisson, essai sur la croissance des juvéniles</i> ; directives supplémentaires tirées de USEPA (1995, 1996g, 2002b) et de ASTM (2000i).
Type d'essai	— Renouvellement intermittent de chaque concentration expérimentale (y compris des témoins) tout au long de l'essai de 28 jours (ou plus), trois fois par semaine en des journées non consécutives (p. ex., tous les lundis, mercredis et vendredis).
Poissons d'essai	— Juvéniles en phase de croissance exponentielle, provenant tous de la même population; la longueur du plus gros poisson ne doit pas être plus de deux fois supérieure à celle du plus petit; l'écart entre le poids frais individuel et le poids frais moyen ne devrait pas être supérieur à 10 %, l'écart maximal devant être de 25 %; espèces recommandées (acclimatées à l'eau de mer) : truite arc-en-ciel (salinité de $\leq 14$ ‰), saumon kéta ou saumon rose pour les essais en eau tempérée avec des substances microbiennes psychrophiles, et <i>M. beryllina</i> , méné tête-de-mouton, capucette barrée ou épinoche à trois épines pour les essais en eau chaude avec des micro-organismes mésophiles.
Température de l'eau	— Plages acceptables : 5–16 °C pour les salmonidés et 19–25 °C pour <i>M. beryllina</i> , le méné tête-de-mouton, la capucette barrée ou l'épinoche à trois épines; température ne s'écartant pas de plus de 2 °C de la moyenne, tout au long de l'essai.
Salinité	— Plages acceptables : $\leq 14$ ‰ pour la truite arc-en-ciel; 10–32 ‰ pour le saumon kéta ou le saumon rose; 5–32 ‰ pour <i>M. beryllina</i> , la capucette barrée ou l'épinoche à trois épines; 20–32 ‰ pour le méné tête-de-mouton; salinité ne s'écartant pas de plus de 2 ‰ de la moyenne, tout au long de l'essai.
Éclairage	— En spectre continu, 100–500 lux à la surface de l'eau; normalement, $16 \pm 1$ h de clarté et $8 \pm 1$ h d'obscurité; de préférence, transition graduelle entre clarté et obscurité et vice versa.
pH	— Aucun rajustement si le pH de la ou des concentrations expérimentales se situe entre 7,0 et 8,5; deuxième essai recommandé (pH rajusté) si le pH d'un traitement se situe en dehors de cette plage.
Oxygène dissous	— $\geq 60$ % de la valeur de saturation dans chaque enceinte expérimentale, tout au long de l'essai; aération modérée dans toutes les enceintes au besoin seulement.
Acclimatation	— Acclimatation aux conditions de l'essai pendant au moins deux semaines (c.-à-d. à la température, à la photopériode et à la salinité de l'eau de mer ou d'estuaire servant d'eau témoin/de dilution).
Eau témoin/de dilution	— Eau de mer naturelle ou artificielle à la salinité retenue pour l'essai; teneur en OD de 90–100 % de la valeur de saturation lorsque l'eau est versée dans les enceintes expérimentales.
Témoins	— Chaque essai doit inclure un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Nombre de poissons par enceinte expérimentale	— 10
Profondeur et densité de chargement	— $\geq 15$ cm dans chaque enceinte expérimentale; densité de chargement de $\leq 0,5$ g/L.
Alimentation	— Au moins une fois par jour tout au long de l'essai, sous forme de boulettes d'aliments pour poissons du commerce; ration quotidienne correspondant à 4 % du poids frais; aucune alimentation pendant les 24 h précédant la pesée.
Modes d'exposition	— Matière d'essai mélangée à l'eau de mer et aux aliments pour un essai à concentration unique; matière d'essai mélangée soit à l'eau de mer, soit aux aliments pour un essai à concentrations multiples.
CDM pour l'eau	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/mL d'eau, ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aqueux (v. § 3.3.1.1).
CDM pour les aliments	— 100 fois la concentration microbienne prévue dans l'environnement aquatique (v. § 3.3.1.3).

- Essai d'infectivité — Facultatif – la décision à cet égard se fonde sur la teneur mesurée en micro-organismes d'un ou de plusieurs tissus, organes ou fluides organiques (p. ex., sang ou urine), ou encore d'un homogénat de corps entiers de poissons de chaque traitement, au cours et/ou au terme de l'essai.
- Mesures — Mesure de la température, du pH, de la salinité et de l'OD au début et à la fin de chaque renouvellement de l'eau, pour au moins une répétition de chaque traitement; poids frais de chaque poisson de chaque enceinte expérimentale au début et à la fin de l'essai (et, facultativement, le jour 14); chaque semaine, si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai ainsi qu'au début et à la fin d'au moins un cycle de renouvellement.
- Observations — Tous les jours jusqu'à la fin de l'essai, observation de la survie, de l'aspect et du comportement des poissons de chaque enceinte expérimentale; autopsie de chaque spécimen mort pendant l'essai et au terme de celui-ci, pour évaluer toute anomalie macroscopique externe et interne; histologie de tissus et d'organes choisis, le cas échéant.
- Paramètres biologiques — Survie, croissance (moyenne  $\pm$  ET du poids frais de poissons individuels), aspect (y compris au moment de l'autopsie pratiquée à la fin de l'essai) et comportement des spécimens de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au cours et au terme de l'essai.
- Validité de l'essai — Essai invalide si la survie est de  $<80\%$  dans le groupe témoin négatif à la fin de l'essai.

### ***Essai à concentration unique***

- Nombre de traitements — Au moins deux (CDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
- Nombre de répétitions — Trois par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
- Nombre de poissons par traitement — 30
- Modes d'exposition — Matière d'essai à sa CDM mélangée à l'eau de mer et aux aliments.
- Paramètres statistiques — Pourcentage de survie des poissons de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au terme de l'essai; poids frais moyen ( $\pm$  ET) de chaque poisson ayant survécu, pour chaque enceinte expérimentale et chaque traitement, à la fin de l'essai; pourcentage de poissons ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont les organes et/ou les tissus ont un aspect atypique à la fin de l'essai.
- Comparaisons statistiques — CDM et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie, dans le poids frais, à la fin de l'essai, de chaque poisson ayant survécu et dans le pourcentage de poissons ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

- Nombre de concentrations (ou nombre de traitements) — Au moins cinq, dont la CDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
- Nombre de répétitions — Une par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
- Nombre de poissons par traitement — 10
- Mode d'exposition — Matière d'essai mélangée à l'eau de mer ou aux aliments (un mode d'exposition par essai).
- Paramètres statistiques — Pourcentage de survie des poissons de chaque traitement, au terme de l'essai; poids frais moyen ( $\pm$  ET) des poissons ayant survécu, pour chaque traitement, à la fin de l'essai; pourcentage de poissons de chaque traitement dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique à la fin de l'essai; si les données le permettent,  $CL_{50}$  28 jours et  $CL_{25}$  28 jours en regard du poids frais des poissons ayant survécu,  $CE_{50}$  28 jours d'après le pourcentage de poissons ayant survécu dans chaque traitement et présentant un aspect et/ou un comportement atypiques; CSEO/CMEO.
- Comparaisons statistiques — Concentrations expérimentales et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie, dans le pourcentage d'organes et/ou de tissus d'aspect atypique, dans le pourcentage de poissons ayant un comportement anormal et dans le poids frais moyen des poissons ayant survécu, à la fin de l'essai; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.
-

quatre espèces suivantes, acclimatées à une température choisie entre 17 °C et 25 °C (v. tableau 9) : *M. beryllina*, le méné tête-de-mouton (*C. variegatus*), la capucette barrée (*Atherinops affinis*) ou l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*). Les deux espèces de capucettes et l'épinoche à trois épines sont sensibles aux contaminants, s'adaptent facilement aux conditions de laboratoire et peuvent tolérer des plages étendues de température et de salinité. L'USEPA (2002b) a publié une méthode d'essai sur la survie et la croissance de *M. beryllina* exposée à des échantillons d'effluents ou d'eaux réceptrices toxiques. L'essai se déroule à une salinité choisie à l'intérieur de la plage de 5–32 ‰ et à une température de  $25 \pm 1$  °C. Une autre méthode de l'USEPA porte sur la survie et la croissance de la capucette barrée exposée à des contaminants dans l'eau de mer, à une salinité choisie entre 5 ‰ et 34 ‰ et à une température de  $20 \pm 1$  °C (USEPA, 1995). L'épinoche à trois épines est également utilisée dans les essais de laboratoire avec des contaminants aquatiques (EC, 1990c), et elle fait partie des espèces que l'ASTM (2000i) recommande d'employer pour les essais de 28 jours en eau de mer<sup>74</sup>. Si l'on envisage de mener un essai de 28 jours sur l'épinoche à trois épines, il serait indiqué de procéder à des essais préliminaires afin de s'assurer que le taux de survie des poissons du groupe témoin est acceptable en regard d'une exposition de 28 jours ou plus<sup>75</sup>. La salinité que l'on recommande d'utiliser pour les essais sur *M. beryllina*, *C. variegatus* et *G. aculeatus* se situe entre 5 ‰ et 32 ‰.

Le méné tête-de-mouton est une espèce moins euryhaline que *M. beryllina* ou l'épinoche à trois épines. L'USEPA (2002b) a publié une méthode d'essai sur la survie et la croissance du méné tête-de-mouton exposé à des échantillons d'effluents ou à une eau d'essai dont la salinité est choisie à l'intérieur

de la plage de 20–32 ‰<sup>76</sup>. C'est donc cette plage que l'on recommande d'appliquer à l'essai de 28 jours avec des micro-organismes mésophiles dont on veut mesurer les effets sur le méné tête-de-mouton dans des conditions d'eau chaude. Selon l'ASTM (2000i), cette espèce convient aux essais de 28 jours portant sur un ou plus d'un contaminant dans l'eau de mer; l'annexe X8 de ASTM (2000m) renferme des directives utiles sur l'élevage des ménés tête-de-mouton et sur la conduite d'essais de 28 jours sur les premiers stades biologiques de l'espèce.

La salinité qu'il convient d'appliquer à un essai de 28 jours sur une espèce choisie de poisson juvénile acclimaté à l'eau de mer dépend de l'utilisation prévue de la nouvelle substance microbienne à l'étude, de même que de la possibilité que la substance pénètre dans des eaux estuariennes ou marines à des teneurs susceptibles d'être nocives. Si la pénétration de la nouvelle substance microbienne dans des estuaires soulève des préoccupations d'ordre écologique, on recommande de mener l'essai à une salinité de  $12 \pm 2$  ‰. Par contre, si l'on se préoccupe plutôt de sa pénétration dans des eaux marines, la salinité sera de  $28 \pm 2$  ‰. Comme dans le cas de la température à laquelle se déroule l'essai, la salinité choisie influe sur l'espèce à utiliser. Environnement Canada a mis au point des procédures relatives à la préparation d'eau de mer à différents degrés de salinité en vue des essais de toxicité sur des organismes estuariens ou marins (EC, 2001b), procédures qui devraient être appliquées aux fins présentes. L'USEPA (2002b) a aussi élaboré des directives semblables.

### 11.2.3 Autres méthodes ou procédures

D'autres méthodes d'essai biologique normalisées peuvent convenir (une fois modifiées, au besoin) à la mesure de la pathogénicité et/ou de la toxicité d'une nouvelle substance microbienne. L'USEPA a publié des méthodes visant à mesurer à court terme, au moyen d'essais de laboratoire sur des organismes et des stades biologiques choisis, la toxicité chronique d'effluents ou d'eaux réceptrices pour des poissons d'estuaire ou de mer. Ces méthodes, qui pourraient être utilisées pour évaluer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne dans des conditions de laboratoire, incluent les suivantes :

<sup>74</sup> Cette espèce présente un certain nombre de caractéristiques convenant aux essais, dont sa petite taille, son adaptabilité à diverses salinités et sa sensibilité aux contaminants aquatiques, sans compter qu'elle est largement répandue dans les eaux côtières canadiennes et que l'on connaît bien sa biologie et son cycle biologique.

<sup>75</sup> En règle générale, les épinoches à trois épines servant aux essais de toxicité en laboratoire sont capturées dans des eaux côtières non contaminées et acclimatées aux conditions de laboratoire (y compris à un régime alimentaire composé de boulettes d'aliments pour poissons du commerce) avant la mise en route de l'essai.

<sup>76</sup> D'après USEPA (2002b), la croissance du méné tête-de-mouton peut être inhibée si la salinité est inférieure à 20 ‰.



- essai de 7 jours à renouvellement intermittent pour mesurer la survie et la croissance de larves de *M. beryllina*, à une température de  $25 \pm 1$  °C (USEPA, 2002b, section 13);
- essai de 7 jours à renouvellement intermittent pour mesurer la survie et la croissance de larves de ménés tête-de-mouton, à une température de  $25 \pm 1$  °C (USEPA, 2002b, section 11);
- essai de 7 jours à renouvellement intermittent pour mesurer la survie et la croissance de larves de capucettes barrées, à une température de  $20 \pm 1$  °C (USEPA, 2002b, section 11);
- essai à renouvellement intermittent où l'on fait appel à des ménés tête-de-mouton fraîchement fécondés, pour mesurer la mortalité des embryons et les difformités macroscopiques, pendant 9 jours ou jusqu'à 4 jours après l'éclosion (selon la date la plus hâtive), à une température de  $25 \pm 1$  °C (USEPA, 2002b, section 12).

On pourrait envisager l'une ou l'autre de ces méthodes pour remplacer l'essai recommandé de 28 jours sur une espèce choisie de poisson (stade juvénile) acclimaté à l'eau de mer (v. § 11.2.2) si la nouvelle substance microbienne est mésophile. Pour les essais sur *M. beryllina* ou sur la capucette barrée, la salinité peut se situer entre 5 ‰ et 32 ‰ (USEPA, 2002b); pour ceux sur le méné tête-de-mouton, la plage est de 20–32 ‰ (USEPA, 1995). Dans tous les cas, les suspensions/solutions d'essai sont renouvelées tous les jours. Pour l'essai de 7 jours sur des larves de *M. beryllina*, de ménés tête-de-mouton ou de capucettes barrées, les poissons sont nourris quotidiennement tout au long de l'essai; quant à l'essai sur des embryons de ménés tête-de-mouton,

aucune alimentation n'est nécessaire. Chacune de ces méthodes d'essai a été conçue pour mesurer la toxicité chronique d'échantillons d'effluents ou d'eaux réceptrices. L'application de ces méthodes en vue de mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne mésophile suppose une exposition suffisamment longue à la matière d'essai pour qu'il y ait infection, c'est-à-dire la manifestation d'effets pathogènes chez l'organisme d'essai pendant la durée limitée des essais (généralement 7 jours). À défaut de données à l'appui, rien ne prouve qu'il y aura infection; par conséquent, il faut faire preuve de prudence lors de l'application de l'un ou l'autre de ces essais à court terme.

Aucun rapport ne mentionne que l'un ou l'autre de ces essais a déjà été utilisé pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité d'un micro-organisme particulier. Dans ses lignes directrices de la série 885 relatives aux essais de niveau 1 sur des animaux estuariens ou marins, l'USEPA (1996e) ne recommande aucune espèce particulière de poisson de mer ou d'estuaire, ni aucune méthode d'essai associée à de telles espèces. Dans USEPA (1996h), on mentionne l'utilisation du méné tête-de-mouton ou de *M. beryllina* pour les essais de niveau 3 visant à mesurer les effets de pesticides microbiens sur le cycle biologique des poissons, mais aucun protocole d'essai faisant autorité n'y est décrit en regard de ces espèces. Dans EC et SC (2001), on ne trouve aucune indication quant aux espèces de poissons à utiliser lors des essais sur les effets d'une nouvelle substance microbienne dans l'eau de mer. Pour sa part, l'ARLA (2001) mentionne que le méné tête-de-mouton ou une autre espèce de poisson d'estuaire ou de mer peuvent être utilisés si un pesticide microbien risque d'avoir des effets sur les eaux marines ou estuariennes.

## Essais sur des plantes terrestres

### Repères

- *L'essai biologique normalisé que l'on recommande d'utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des plantes terrestres consiste en un essai sur la levée, la croissance et l'aspect d'une espèce agricole, maraîchère ou herbagère choisie.*
- *La méthode d'essai biologique, qui a été adaptée de celle décrite dans EC (2004a), débute avec des graines de l'espèce choisie. Les paramètres incluent le pourcentage de levée des plantules pendant l'essai, la mesure de la longueur et de la masse sèche des pousses et des racines, de même que le pourcentage de plantes qui ont survécu et qui présentent, à la fin de l'essai, des signes de pathologie, dont des lésions, des nécroses et une chlorose.*
- *Dans le cas d'un essai à concentration unique, la matière d'essai est mélangée (au début de l'expérience seulement) au sol d'essai dans lequel les plantes croissent ainsi qu'à l'eau d'essai vaporisée sur les plantes levées et sur la surface du sol, à intervalles réguliers tout au long de l'essai. Dans le cas d'un essai à concentrations multiples, elle est mélangée soit au sol, soit à l'eau.*

### 12.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens

Douville (2001) a passé en revue la documentation scientifique décrivant les procédures applicables aux essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques de micro-organismes ou de produits microbiens sur des espèces choisies de plantes terrestres. Sur les 148 documents examinés, 68 faisaient état d'une exposition à des bactéries, 39 à des virus et 39 à des champignons. Les procédures variaient et aucune méthode d'essai biologique normalisée ne ressortait clairement. Les modes d'exposition, également variables d'une étude à l'autre, incluaient la vaporisation, le mélange dans le sol, le trempage des racines ou des tubercules, l'inoculation dans la portion superficielle du sol, l'injection dans diverses parties des plantes, des lésions par divers moyens et l'utilisation d'insectes (p. ex., des aphidés) comme vecteurs. En général, la durée de l'exposition était brève (de quelques secondes jusqu'à 24 h), et celle des essais allait de quelques heures jusqu'à 2 ans

après l'exposition. Les paramètres ultimes, qui étaient aussi diversifiés, se fondaient souvent sur des observations des *nécroses*, des lésions et de la *chlorose*; ils incluaient parfois des mesures de la croissance. Lorsque les essais débutaient avec des graines, les observations et paramètres avaient trait à la *levée*, à la croissance et à la survie des *plantules* (Douville, 2001).

Des lignes directrices de la série 885 de l'USEPA sur les AAM ou leurs produits décrivent les essais de laboratoire portant sur des plantes non visées (USEPA, 1996c). On y indique que les espèces hôtes à utiliser dans les essais devraient être choisies parmi celles ayant la plus importante valeur commerciale et qu'elles devraient inclure des dicotylédones et des monocotylédones. Selon l'USEPA (1996c), le ou les modes d'exposition retenus devraient correspondre au profil d'emploi proposé, dans le milieu naturel, de la préparation commerciale de l'AAM. Parmi les divers modes qui semblent les plus appropriés, on compte les suivants : vaporisation du feuillage, traitement des graines, application sur les racines ou le sol, application directe dans l'eau; dans certains cas, lésions infligées aux plantes ou utilisation d'insectes vecteurs. L'exposition devrait être suffisamment longue pour permettre la manifestation d'une réaction pathogène différée (USEPA, 1996b), et elle peut se poursuivre jusqu'à la récolte effectuée en temps normal ou jusqu'à la mort des plantes (USEPA, 1996c). Les observations et paramètres se limitent à ceux associés aux « effets nocifs évidents ».

D'après EC et SC (2001), on devrait avoir recours, pour les essais, à des plantes terrestres représentatives des espèces canadiennes ayant une importance écologique ou économique, notamment des espèces agricoles ou forestières généralement répandues au Canada. Ce document ne renferme toutefois aucune autre précision quant aux essais sur des plantes terrestres.

L'ARLA (Santé Canada) a publié des directives semblables à celles que l'on trouve dans USEPA (1996c) pour les essais visant à mesurer les effets d'AAM et de leur PC sur des plantes terrestres [v. partie 9.8 dans ARLA (2001)]. L'ARLA, qui a adopté dans ces directives le ou les modes

d'exposition mentionnés dans USEPA (1996c), recommande de choisir les plantes d'essai (hôtes) dans une liste de douze familles de plantes terrestres ayant une importance écologique ou économique au Canada. Pour les AAM et les PC destinés à des applications forestières, l'ARLA (2001) indique qu'il faut choisir des essences appartenant aux pinacées et aux silicacées. L'ARLA exige peu d'essais, sinon aucun essai, dans le cas des AAM qui n'offrent de ressemblance avec aucun phytopathogène connu, de même que dans le cas des pesticides microbiens destinés à la lutte contre des plantes aquatiques (ARLA, 2001).

Dans sa réponse à un questionnaire non officiel (v. § 8.8), la division des pesticides microbiens de l'USEPA indique que les effets de ~20 AAM (ou leur PC) sur des plantes terrestres ont été évalués conformément aux lignes directrices que renferme USEPA (1996c). Sur ces essais de 30 jours (ou plus), ~10 ont été menés avec des AAM microbiens et ~10 avec des AAM fongiques. Seule la CDM a été utilisée dans tous les cas. Dans 10 % des essais, on a détecté des indices d'effets pathogènes et/ou toxiques. Aucun des essais ne comportait de témoin microbien positif ou de témoin sur filtrat stérile, tandis que 10 % incluaient un témoin chimique positif et 10 % également, un témoin non infectieux. Les concentrations microbiennes auxquelles les plantes terrestres ont été exposées n'ont pas été établies, et l'on n'a procédé à aucune mesure de l'infectivité.

## 12.2 Méthode d'essai biologique recommandée

Il est recommandé d'utiliser une version modifiée de la méthode d'essai biologique d'Environnement Canada, qui porte sur la détermination de la toxicité de substances d'essai en regard de plantes terrestres (EC, 2004a), pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne sur cette catégorie d'organismes d'essai (hôtes). Cette méthode modifiée (résumée au tableau 10) est conforme dans l'ensemble à celle que prescrit l'USEPA (1996c). Environnement Canada recommande d'utiliser, comme organisme d'essai (hôte), une ou plusieurs des espèces agricoles, maraîchères ou herbagères suivantes :

### Monocotylédones

- orge (*Hordeum vulgare* var. Chapais),
- boutelou gracieux (*Bouteloua gracilis*),
- agropyre du Nord (*Elymus lanceolatus*; ancien nom: *Agropyron dasystachyum*),
- fétuque rouge (*Festuca rubra* var. traçante),
- blé dur (*Triticum durum* var. durum).

### Dicotylédones

- luzerne (*Medicago sativa* var. fourragère),
- carotte (*Daucus carota* var. Royal Chantenay),
- concombre (*Cucumis sativa* var. Marketmore76),
- laitue (*Lactuca sativa* var. Buttercrunch),
- radis (*Raphanus sativus* var. Champion ou Cherry Belle),
- trèfle violet (*Trifolium pratense* var. fourragère),
- tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Heinz 1439).

La durée de l'essai est de 14 jours ou de 21 jours, selon l'espèce de plante choisie. L'essai débute avec des graines, et les mesures portent sur les effets nocifs de la matière d'essai sur la croissance des plantes dans le sol. Dans un essai à concentration unique, la matière d'essai est mélangée au sol d'essai ainsi qu'à l'eau d'essai utilisée pour mouiller ce dernier et arroser les plantes; dans un essai à concentrations multiples, on utilise un seul de ces deux modes d'exposition. Il convient de consulter EC (2004a), qui renferme des spécifications autres que celles décrites ou résumées ici sur le déroulement de cette méthode d'essai biologique.

Deux éléments influent sur le choix des espèces à utiliser : le mode prévu de pénétration ou de dispersion de la matière d'essai dans l'environnement terrestre; la probabilité que la matière d'essai vienne en contact avec des espèces identiques ou similaires à celles recommandées comme organismes d'essai (hôtes) (v. tableau 10). Il faudrait aussi tenir compte

**Tableau 10 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité sur diverses espèces de plantes terrestres**

**Essai universel**

Méthode d'essai	— Conforme à EC (2004a), <i>Méthode d'essai biologique : essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol</i> (titre provisoire).
Type d'essai	— Mesure des effets nocifs sur les graines et la croissance de plantes terrestres.
Durée de l'essai	— 14 jours pour l'orge, le blé dur, la luzerne, le concombre, la laitue, le radis, le trèfle violet et la tomate; 21 jours pour la carotte, le boutelou gracieux, l'agropyre du Nord et la fétuque rouge.
Espèces d'essai	— Monocotylédones : choisir l'une ou l'autre des espèces suivantes : orge ( <i>H. vulgare</i> var. Chapais), boutelou gracieux ( <i>B. gracilis</i> ), agropyre du Nord ( <i>E. lanceolatus</i> ; ancien nom : <i>A. dasystachyum</i> ), fétuque rouge ( <i>F. rubra</i> var. traçante) ou blé dur ( <i>T. durum</i> var. durum). Dicotylédones : choisir l'une ou l'autre des espèces suivantes : luzerne ( <i>M. sativa</i> var. fourragère), carotte ( <i>D. carota</i> var. Royal Chantenay), concombre ( <i>C. sativa</i> var. Marketmore76), laitue ( <i>L. sativa</i> var. Buttercrunch), radis ( <i>R. sativus</i> var. Champion ou Cherry Belle), trèfle violet ( <i>T. pratense</i> var. fourragère) ou tomate ( <i>L. esculentum</i> var. Heinz 1439).
Sol	— Naturel ou artificiel (préparé en laboratoire).
Enceinte expérimentale	— Contenant en polystyrène de 1L, muni d'un couvercle jusqu'à ce que les plantes atteignent le bord supérieur du contenant.
Quantité de sol par enceinte expérimentale	— 500 g (masse humide).
Teneur en humidité du sol d'essai	— Si le sol est prélevé sur le terrain, l'hydrater et le mélanger, au besoin, jusqu'à l'obtention d'une texture granulaire homogène; s'il s'agit d'un sol artificiel, l'hydrater à ~70 % de sa capacité de rétention d'eau.
Nombre de graines par enceinte expérimentale	— 5 pour l'orge, l'agropyre du Nord, la fétuque rouge, le blé dur, le concombre, la laitue, le radis, le trèfle violet et la tomate; 10 pour le boutelou gracieux, la luzerne et la carotte.
Température	— Moyenne quotidienne de $24 \pm 2$ °C pendant le jour et de $15 \pm 2$ °C pendant la nuit, tout au long de l'essai.
Éclairage	— En spectre continu (fluorescent ou l'équivalent); $16 \pm 1$ h de clarté et $8 \pm 1$ h d'obscurité; intensité de $\sim 400 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ .
Arrosage	— Vaporisation de l'eau d'essai sur les plantes et la surface du sol jusqu'à saturation de ce dernier, tous les trois jours lorsque les enceintes sont dotées de couvercles, puis une ou deux fois par jour lorsque les couvercles sont enlevés.
Témoins	— Chaque essai doit comporter un témoin négatif; il faut déterminer la sensibilité des organismes d'essai à un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
Modes d'exposition	— Matière d'essai mélangée à l'eau et au sol pour un essai à concentration unique; matière d'essai mélangée soit à l'eau, soit au sol pour un essai à concentrations multiples.
CDM pour l'eau	— La concentration microbienne doit équivaloir (ou ne pas être inférieure) à la concentration maximale précisée par le déclarant pour le mélange final en cuve d'un produit microbien lorsqu'il est appliqué à la « dose maximale figurant sur l'étiquette » (v. § 3.3.1.4).
CDM pour le sol	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/g de sol (masse sèche), ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans le sol de l'environnement terrestre (v. § 3.3.1.5).
Essai d'infectivité	— Facultatif – la décision à cet égard se fonde sur la teneur mesurée en nouvelle substance microbienne d'homogénats de plantes entières de chaque traitement, au cours et/ou au terme de l'essai.
Mesures	— Mesure de la température de l'installation d'essai, maximum/minimum quotidiens ou en continu; teneur en humidité (%), conductivité et pH, au début et à la fin de l'essai pour au moins une répétition de chaque traitement; intensité lumineuse dans l'installation, au moins une fois pendant l'essai; si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne dans le sol de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai au moins.

Observations	—	Nombre de plantules levées le jour 7 et au terme de l'essai, dans chaque enceinte expérimentale; longueur et masse sèche des pousses/racines à la fin de l'essai; nombre de plantes ayant survécu et dont l'aspect est atypique (p. ex., chlorose, lésions) à la fin de l'essai.
Paramètres biologiques	—	Levée des plantules pendant l'essai; longueur des pousses et de la racine la plus longue; masse sèche des pousses et des racines; aspect des plantes ayant survécu, au terme de l'essai.
Validité de l'essai	—	Essai invalide si les plantes du sol témoin négatif présentent l'une ou l'autre des caractéristiques suivantes à la fin de l'essai : <u>taux moyen de levée</u> : carotte, <60 %; luzerne, concombre, boutelou gracieux, laitue, fétuque rouge et tomate, <70 %; orge, agropyre du Nord, blé dur et trèfle violet, <80 %; radis, <90 %; <u>longueur moyenne des racines</u> : carotte et tomate, <40 mm; boutelou gracieux et fétuque rouge, <70 mm; laitue et trèfle violet, <100 mm; radis, agropyre du Nord, luzerne et concombre, <120 mm; orge et blé dur, <200 mm; <u>longueur moyenne des pousses</u> : laitue et trèfle violet, <20 mm; carotte, <40 mm; radis, luzerne, concombre, boutelou gracieux et tomate, <50 mm; agropyre du Nord et fétuque rouge, <80 mm; orge et blé dur, <130 mm.

### ***Essai à concentration unique***

Nombre de traitements	—	Au moins deux (CDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
Nombre de répétitions	—	Six par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
Nombre de graines par traitement	—	30 pour l'orge, l'agropyre du Nord, la fétuque rouge, le blé dur, le concombre, la laitue, le radis, le trèfle violet et la tomate; 60 pour le boutelou gracieux, la luzerne et la carotte.
Paramètres statistiques	—	Pour chaque enceinte expérimentale et chaque traitement : pourcentage de levée le jour 7 et à la fin de l'essai; pourcentage de plantes ayant survécu (levées) et dont l'aspect est atypique à la fin de l'essai; longueur moyenne ( $\pm$ ET) des pousses et des plus longues racines à la fin de l'essai; masse sèche moyenne ( $\pm$ ET) des pousses et des racines à la fin de l'essai.
Comparaisons statistiques	—	CDM et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de levée, dans le pourcentage de plantes présentant un aspect atypique, dans la longueur moyenne des pousses et des plus longues racines et dans la masse sèche moyenne des pousses et des racines, à la fin de l'essai; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

Nombre de concentrations (ou nombre de traitements)	—	Au moins neuf, dont la CDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
Nombre de répétitions	—	Six par traitement, pour chaque témoin (négatif ou autre); quatre pour chacune des trois concentrations les plus faibles; trois pour chacune des trois concentrations médianes; deux pour chacune des trois concentrations les plus élevées.
Nombre de graines par traitement	—	30 par témoin (négatif ou autre) pour l'orge, l'agropyre du Nord, la fétuque rouge, le blé dur, le concombre, la laitue, le radis, le trèfle violet et la tomate; 60 par témoin (négatif ou autre) pour le boutelou gracieux, la luzerne et la carotte.
Paramètres statistiques	—	Pour chaque enceinte expérimentale et chaque traitement : pourcentage de levée le jour 7 et à la fin de l'essai; pourcentage de plantes ayant survécu (levées) et dont l'aspect est atypique à la fin de l'essai; longueur moyenne ( $\pm$ ET) des pousses et des plus longues racines à la fin de l'essai; masse sèche moyenne ( $\pm$ ET) des pousses et des racines à la fin de l'essai; si les données le permettent, $CE_{50}$ 7 jours et 21 jours en regard de la levée, $CE_{50}$ 21 jours en regard de l'aspect des plantes, $CI_{25}$ 21 jours en regard de la longueur et de la masse des pousses et des racines des plantes ayant survécu.
Comparaisons statistiques	—	Concentrations expérimentales et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de levée, dans le pourcentage de plantes présentant un aspect atypique, dans la longueur moyenne des pousses et des plus longues racines et dans la masse sèche moyenne des pousses et des racines, à la fin de l'essai; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

---

lors de ce choix, de l'information dont on dispose sur la sensibilité de l'espèce ou des espèces en question à la matière d'essai, de même que de leur ressemblance avec les espèces d'essai prescrites ici. La sous-section 8.5 renferme des indications supplémentaires sur le choix des espèces de plantes à inclure dans les essais menés conformément à la méthode recommandée dans la présente section.

Dans un essai à concentration unique, la CDM pour le sol et celle pour l'eau devraient être appliquées aux organismes d'essai selon ces deux modes d'exposition (§ 3.2). Les sous-sections 3.4.1 et 3.4.3 renferment des indications sur le mélange et l'administration de la matière d'essai dans l'eau et dans le sol, respectivement. La portion de la matière d'essai à sa CDM (v. § 3.3.1) qui est administrée dans le sol doit être mélangée à un échantillon de sol *non contaminé* préparé en laboratoire (artificiel) ou prélevé sur le terrain. Cette administration de la matière d'essai dans le sol a lieu une seule fois, juste avant l'ajout des graines dans les enceintes expérimentales. La portion de la matière d'essai à sa CDM (§ 3.3.1) qui est administrée dans l'eau doit être mélangée à un échantillon de l'eau désionisée dont on se sert pour humecter le sol avant et pendant l'essai. Ce mélange de matière d'essai (à sa CDM) et d'eau est appliqué tous les trois jours pendant la première partie de l'essai, soit lorsque chaque enceinte expérimentale est dotée d'un couvercle, puis une ou deux fois par jour une fois les couvercles enlevés (tableau 10). Juste avant chaque application, on conseille de préparer un mélange frais de matière d'essai et d'eau, puis de vaporiser celui-ci sur la surface du sol des enceintes expérimentales et sur le feuillage des plantes qu'elles contiennent, jusqu'à ce que la surface du sol soit saturée d'eau (EC, 2004a). Il faut procéder de la même façon pour le traitement témoin négatif et tout autre témoin. En d'autres termes, on utilise la même quantité d'eau désionisée seulement (dans le cas du témoin négatif) ou une quantité et une concentration identiques (c.-à-d. la CDM) de la matière d'essai modifiée dont on a besoin pour le témoin sur filtrat stérile ou le témoin non infectieux.

Si l'on procède à un essai à concentrations multiples, on devrait mesurer séparément les effets de chacun de ces modes d'exposition (v. § 3.2). La décision quant au mode à privilégier dépend de la façon dont la nouvelle substance microbienne sera appliquée dans l'environnement (p. ex., sous forme de pulvérisation

aérienne ou de solide répandu sur le sol ou mélangé à celui-ci) et de la voie ou des voies par lesquelles la substance viendra vraisemblablement en contact avec les plantes. S'il est probable que ce sera par le biais de l'eau (p. ex., pulvérisation aérienne) et du sol (assimilation), on devrait mener un essai à concentrations multiples distinct pour chacun de ces modes d'exposition. Si un essai à concentrations multiples comportant un de ces deux modes d'exposition ne provoque aucun effet nocif observable à la CDM et à des concentrations plus faibles, mais qu'un essai à concentration unique mené antérieurement selon les deux modes a provoqué de tels effets, il faut procéder à un deuxième essai à concentrations multiples en utilisant l'autre mode d'exposition utilisé simultanément dans cet essai à concentration unique. Dans chaque essai à concentrations multiples, il faut utiliser la matière d'essai à sa CDM et à des concentrations plus faibles pour chaque mode d'exposition; il faut aussi prévoir un témoin négatif et, selon le plan de l'étude, un ou plus d'un autre témoin (v. § 3.3.2 et section 4). La méthode d'essai biologique décrite ici exige au moins neuf concentrations expérimentales ainsi qu'un témoin ou plus (EC, 2004a) afin d'accroître la possibilité de mesurer chacun des paramètres statistiques prévus dans l'essai à concentrations multiples (v. tableau 10).

Comme pour les autres méthodes d'essai biologique applicables à de nouvelles substances microbiennes, chaque essai sur les espèces de plantes terrestres recommandées (v. tableau 10) doit inclure un témoin négatif. Conformément à EC (2000b), il faut utiliser un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif) dans le cadre de l'essai (ou parallèlement à celui-ci) (v. § 4.2), selon les spécifications que l'on trouve dans EC (2004a). Il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux (§ 4.4), tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile (§ 4.5) est facultatif, mais recommandé. La mesure de l'infectivité, effectuée au terme de l'essai<sup>77</sup> sur des homogénats de plantes entières de chaque traitement,

<sup>77</sup> Au besoin — et si cela est prévu dans le cadre expérimental —, on peut mesurer et surveiller l'infectivité tout au long de l'essai et au terme de celui-ci. Pour les mesures effectuées pendant l'essai, il faudrait prévoir des enceintes expérimentales supplémentaires pour les échantillonnages destructifs effectués au moment prévu (p. ex., les jours 7 et 14) afin de déterminer les teneurs microbiennes d'homogénats d'organismes entiers représentant chaque traitement.

est également facultative et dépend des objectifs de l'étude (v. section 5).

Les paramètres biologiques et statistiques inclus dans la méthode d'essai sont fondés sur les observations suivantes, qui visent chaque enceinte expérimentale et chaque traitement :

- (i) le nombre de plantules levées le jour 7 et à la fin de l'essai;
- (ii) la longueur des pousses et des racines les plus longues;
- (iii) la masse sèche des pousses et des racines;
- (iv) le nombre de plantes ayant survécu et présentant un aspect atypique (p. ex., lésions ou chlorose).

Le tableau 10 indique les paramètres statistiques applicables aux essais à concentration unique et à concentrations multiples, de même que les comparaisons statistiques à établir pour chaque traitement.

Dans le cas d'un essai à concentration unique, les paramètres statistiques à mesurer en regard des plantes de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement (y compris celles du ou des traitements témoins) incluent les suivants :

- a) le pourcentage de plantes levées le jour 7 et à la fin de l'essai;
- b) le pourcentage de plantes levées présentant un aspect atypique à la fin de l'essai;
- c) la longueur moyenne ( $\pm$  ET) des pousses à la fin de l'essai;
- d) la longueur moyenne ( $\pm$  ET) des racines les plus longues à la fin de l'essai;
- e) la masse sèche moyenne ( $\pm$  ET) des pousses à la fin de l'essai;
- f) la masse sèche moyenne ( $\pm$  ET) des racines à la fin de l'essai.

Ces paramètres servent aux comparaisons statistiques des données dérivées pour la CDM et le témoin négatif, de même que des données sur le témoin

négatif et sur tout autre témoin inclus dans l'essai (tableau 10). On devrait utiliser, pour chaque ensemble de données, un test statistique convenant aux comparaisons par paire (comme le *test de Student*). Il convient de consulter les méthodes statistiques que renferme le guide des essais d'écotoxicité d'Environnement Canada (EC, 2004d) pour déterminer les paramètres à mesurer ainsi que pour choisir les méthodes à appliquer.

Les paramètres statistiques décrits ci-dessus s'appliquent également aux essais à concentrations multiples. Si les données le permettent (v. § 3.3.2), la  $CL_{50}$  en regard de l'inhibition de la levée devrait être établie le jour 7 et à la fin de l'essai, de même que ses limites de confiance de 95 %. La  $CE_{50}$  en regard de l'aspect des plantes ayant survécu devrait être calculée à la fin de l'essai si l'on dispose de suffisamment de données; pour ce faire, on se fondera sur le pourcentage de plantes de chaque traitement présentant, à la fin de l'essai, des signes de pathogénicité et/ou de toxicité (p. ex., lésions, nécroses ou chlorose). On devrait tenter d'établir la  $CI_{25}$  (et ses limites de confiance de 95 %) au terme de l'essai (c.-à-d. les jours 14 et 21, selon l'espèce de plante hôte) pour chacune des quatre mesures suivantes de la croissance des plantes :

- la longueur des pousses à la fin de l'essai;
- la longueur des racines les plus longues à la fin de l'essai;
- la masse sèche des pousses à la fin de l'essai;
- la masse sèche des racines à la fin de l'essai.

Pour le choix et l'application des tests statistiques appropriés, il convient de consulter EC (2004d), qui décrit les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité monospécifiques menés en laboratoire.

### ***12.3 Autres méthodes ou procédures***

Campbell et Sands (1992) ont passé en revue les méthodes et procédures applicables aux essais visant à mesurer les effets d'agents microbiens sur des plantes terrestres. Ils ont indiqué qu'il n'existait pas de méthode normalisée ou d'ensemble de protocoles acceptés pour la conduite de tels essais. Leur étude documentaire renferme cependant des recommandations valables quant aux espèces à

utiliser, aux conditions des essais, aux modes d'exposition des plantes, aux paramètres ultimes, aux statistiques et aux plans d'expérience.

L'ASTM a publié un guide des essais de toxicité pour des plantes terrestres (ASTM, 2000n). Ce document décrit différentes méthodes conçues pour déterminer les effets de substances d'essai sur la croissance et le développement des plantes. En voici des exemples :

- essais à court terme pour mesurer des paramètres physiologiques (c.-à-d. des *biomarqueurs*);
- essais à court terme pendant les premiers stades de croissance des plantes, dont plusieurs paramètres ont trait à la survie, à la croissance et au développement;
- essai visant à déterminer les effets inhibiteurs de substances d'essai sur la croissance et le développement d'espèces de plantes ligneuses dans des conditions de laboratoire;
- essais sur le cycle biologique, où l'accent est mis sur le succès de reproduction.

On trouve également dans ASTM (2000n) des indications utiles sur les méthodes et procédures d'essai qui sont semblables à celles recommandées ici ou qui en diffèrent (v. § 12.2).

S'ils peuvent être adaptés aux fins de la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques de substances microbiennes, les essais sur le cycle biologique (ou d'autres fondés sur la croissance et le développement des plantes) décrits dans ASTM (2000n) peuvent constituer des solutions de rechange acceptables à la méthode recommandée à la sous-section 12.2 pour les essais visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne sur une ou plusieurs espèces de plantes terrestres.

Selon le profil d'emploi prévu de la nouvelle substance microbienne, il pourrait être indiqué d'utiliser une essence forestière comme organisme d'essai (hôte). Conformément à ARLA (2001), on peut utiliser des essences appartenant aux pinacées et aux silicacées. Bon nombre des procédures et paramètres propres à la méthode d'essai biologique décrite à la sous-section 12.2 pour des espèces agricoles peuvent s'appliquer à des essais sur des essences forestières. Il pourrait toutefois être

nécessaire de modifier la méthode pour ce qui est, par exemple, de la durée des essais. Ainsi, ces derniers doivent être suffisamment longs pour permettre la manifestation d'effets sur le développement et la croissance, de même que l'apparition de pathologies (p. ex., lésions ou nécroses) attribuables à la maladie. À l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode reconnue et normalisée d'essais de laboratoire dont on a démontré qu'ils pouvaient servir à mesurer les effets écologiques de nouvelles substances microbiennes sur une ou des semences d'arbres que l'on trouve communément dans les régions forestières canadiennes. Il est justifié de mettre au point et de normaliser une telle méthode.

Des chercheurs ont infligé des lésions (coupes ou entailles) à des parties de plantes (p. ex., feuilles, pédoncules ou racines) en vue d'exposer celles-ci à un micro-organisme ou à un produit microbien particulier (Douville 2001). On trouve dans Dhingra et Sinclair (1995) un texte utile sur les méthodes de base dans le domaine de la phytopathologie, dont une description de diverses procédures à utiliser pour infliger des lésions et inoculer des micro-organismes à des espèces agricoles ou à des essences forestières, de même que des essais à mener ultérieurement pour mesurer la résistance à la maladie. Il est établi que les lésions constituent, chez les plantes, la principale porte d'entrée d'un grand nombre de virus et de bactéries. En conséquence, si l'on sait ou présume qu'une nouvelle substance microbienne « profitera » de la présence de lésions pour infecter un organisme, la méthode d'essai retenue devrait être d'une durée suffisante<sup>78</sup> et comporter l'infliction de lésions aux plantes levées de chaque traitement. Par exemple, on peut utiliser un mélange renfermant l'*eau d'essai* et un abrasif fin, comme le Carborundum<sup>MD</sup> (carbure de silicium) de 500–600 mesh ou le Celite<sup>MD</sup> (terre de diatomées), et en frotter à la main une feuille de chaque plante. L'abrasif peut aussi être mélangé à une portion de l'*eau d'essai* (c.-à-d. celle renfermant la CDM ou une concentration plus faible dans le cas d'un essai à concentrations multiples, ou l'eau *non*

<sup>78</sup> La durée de la méthode d'essai biologique recommandée à la sous-section 12.2 pour les plantes terrestres n'est que de 14 ou 21 jours (selon l'espèce choisie), ce qui n'est pas suffisant pour que les plantes atteignent un stade biologique où des lésions peuvent être provoquées et pour que les effets nocifs d'une substance microbienne se manifestent. La méthode d'essai modifiée, d'une durée suffisante (p. ex., 6–8 semaines ou plus), devrait prévoir des lésions aux plantes de chaque traitement inclus dans le plan expérimental.



*contaminée* employée seule pour le traitement témoin négatif) servant à hydrater les plantes pendant l'essai (v. § 12.2), puis être vaporisé sur les plantes à l'aide d'un canon à air comprimé conçu à cette fin. Dans chaque cas, on recommande d'utiliser un mélange renfermant 50–100 mg d'abrasif par millilitre d'eau d'essai. L'une ou l'autre de ces deux procédures combinant lésions et inoculation n'est appliquée qu'une seule fois pour chaque traitement, lorsque les plantes comptent entre 5 et 7 feuilles. La procédure doit être la même pour les plantes levées de chaque traitement, y compris celles du groupe témoin négatif et des autres témoins, et les lésions doivent être infligées au même moment.

Pour les lésions et l'inoculation manuelles, une goutte du mélange renfermant l'abrasif et l'*eau d'essai* (c.-à-d. l'eau non contaminée ou celle renfermant la CDM ou une concentration plus faible de la nouvelle substance microbienne) est appliquée à raison de 100 µL d'inoculat sur une feuille de chaque plante de l'enceinte expérimentale. Les feuilles choisies à cette fin ne devraient pas compter parmi les feuilles primordiales ou les très petites feuilles.

Immédiatement après l'application, la goutte devrait être étalée sur la feuille avec le doigt (ganté) ou un

coton-tige stérile; aucune pression ne doit être exercée. Il faut utiliser un nouveau gant ou un nouveau coton-tige pour chaque traitement. Deux ou trois minutes après la lésion et l'inoculation de chaque plante de l'enceinte expérimentale, on rince les plantes avec l'eau d'essai réservée à ce traitement.

Pour les lésions et l'inoculation réalisées à l'aide d'un canon à air comprimé conçu à cette fin (p. ex., Laidlaw, 1986, 1987), le mélange d'abrasif et d'eau d'essai est vaporisé directement sur les feuilles de chaque plante des enceintes expérimentales. Il a été démontré, au cours de travaux de recherche, que cette procédure mécanique permettait de provoquer des taux plus élevés d'infection virale que la procédure manuelle (Laidlaw, 1986, 1987). Cependant, les vaporisations accroissent le risque de contamination de l'opérateur et de la zone environnante (et la contamination croisée des traitements avoisinants). Les mesures de sécurité à prendre incluent le port d'un masque protecteur pendant la vaporisation de l'abrasif et de l'inoculat. Deux ou trois minutes après la vaporisation du mélange d'abrasif et d'inoculat, on rince toutes les plantes des enceintes expérimentales avec l'eau d'essai réservée à ce traitement.

## Essais sur des invertébrés terrestres

### Repères

- À l'heure actuelle, aucun essai de pathogénicité et/ou de toxicité employant des abeilles domestiques ou d'autres espèces d'invertébrés terrestres phytophiles (c.-à-d. des insectes pollinisateurs ou foliaires) ne peut être recommandé en raison de l'absence de méthodes normalisées. La normalisation d'une méthode d'essai applicable aux abeilles domestiques ou à d'autres espèces d'insectes bénéfiques est souhaitable. La mise au point d'un essai sur ce type d'insectes est particulièrement pertinente dans le cas de nouvelles substances microbiennes dispersées par pulvérisation aérienne dans l'environnement terrestre.
- Il est recommandé de mener un essai de 8 semaines (56 jours) sur le ver de terre *Eisenia andrei* pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des invertébrés terrestres endogés. Un tel essai est tout indiqué pour les substances qui entrent en contact ou sont mélangées avec le sol où vivent des vers de terre. Il permet de mesurer les effets d'une exposition de 28 jours sur la survie, le comportement, l'aspect et le succès de reproduction de vers adultes, de même que sur la survie, la croissance, le comportement et l'aspect de leurs descendants pendant les 28 jours qui suivent. Dans un essai à concentration unique, l'espèce est exposée à la matière d'essai mélangée au sol et aux aliments; dans un essai à concentrations multiples, un seul de ces modes est employé.
- Il est recommandé d'utiliser un essai de 28 jours sur le collembole *Folsomia candida* comme méthode supplémentaire ou de remplacement pour mesurer les effets nocifs de nouvelles substances microbiennes sur des invertébrés endogés. Un tel essai est indiqué pour les substances qui entrent en contact ou sont mélangées avec le sol où vivent des collemboles. Il permet de mesurer les effets d'une exposition de 28 jours sur la survie de collemboles de la première génération et sur le taux de reproduction de leurs descendants. L'espèce est exposée à la matière d'essai mélangée au sol.

### 13.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens

Douville (2001) a constaté que de nombreuses études de recherche ont porté sur les effets pathogènes et/ou toxiques de micro-organismes ou de produits microbiens donnés sur des espèces d'invertébrés terrestres dans des conditions de laboratoire contrôlées (essais monospécifiques). Les espèces et les stades biologiques choisis variaient d'une étude à l'autre, tout comme le ou les modes d'exposition, la durée des essais et les procédures et paramètres propres à chaque étude. Sur les 154 documents examinés, 71 faisaient état d'une exposition à des bactéries, 36 à des virus et 24 à des champignons.

L'étude documentaire de Douville (2001) révèle que, en général, les espèces hôtes exposées à des micro-organismes ou à des produits microbiens étaient des insectes de l'ordre des lépidoptères; il s'agissait, dans la majorité des cas, de ravageurs agricoles. Certaines des études faisaient appel à l'abeille domestique (*Apis mellifera*) ou à la coccinelle convergente (*Hippodamia convergens*), deux espèces bénéfiques non visées. D'autres ont porté sur le grillon domestique (*Acheta domesticus*), la chrysope verte (*Chrysoperla carnea*) ou des guêpes parasites (*Nasonia vitripennis* ou *Aphidius colemani*) de l'ordre des hyménoptères. Outre ces espèces d'insectes, des vers de terre (*Lumbricus terrestris* ou *Eisenia fetida*) ou des nématodes ont servi d'espèces hôtes dans un nombre limité d'études où des invertébrés endogés ont été exposés à des substances microbiennes.

Le plus souvent, les invertébrés hôtes étaient exposés à des substances microbiennes mélangées aux aliments (Douville, 2001). Les autres modes d'exposition étaient les suivants : application topique de la matière d'essai sur les insectes, trempage d'insectes à différents stades biologiques dans la matière d'essai, injection et vaporisation. Dans le cas d'invertébrés terrestres vivant sur ou dans le sol, la matière d'essai était mélangée au sol. Nombre de chercheurs étaient d'avis que l'administration dans les aliments constituait un mode d'exposition approprié du fait que les bactéries, virus et protozoaires pénétraient généralement dans l'organisme des

invertébrés terrestres par le tube digestif (Douville 2001).

Dans les études examinées par Douville, la durée des essais était fonction des espèces hôtes et des stades biologiques choisis. Souvent, l'exposition à la matière d'essai consistait en une seule application topique ou une seule injection, par exemple, au début de l'essai. La durée des observations allait de quelques heures à plusieurs jours, ou encore jusqu'à l'atteinte d'un stade donné de développement (Douville, 2001). La mortalité constituait généralement le paramètre ultime. Les mesures de la croissance, du développement, de la longévité des adultes, de la reproduction et des symptômes de maladie servaient parfois de paramètres biologiques.

Dans le cadre de ses lignes directrices de la série 885 sur les pesticides microbiens, l'USEPA a publié une méthode d'essai visant à mesurer les effets d'AAM ou de leur PC sur des insectes non visés utilisés comme organismes hôtes (USEPA, 1996i). Un autre document de la série porte sur les essais de pathogénicité et/ou de toxicité d'AAM ou de leur PC pour des abeilles domestiques (USEPA, 1996j).

Il est indiqué, dans USEPA (1996i), que les essais visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'AAM ou de leur PC sur des insectes non visés devraient faire appel à trois espèces choisies dans au moins deux des groupes prescrits (c.-à-d. les diptères parasites, les hémiptères prédateurs, les coléoptères prédateurs, les acariens prédateurs, les neuroptères prédateurs et les hyménoptères parasites). Le mode d'exposition devrait correspondre à celui le plus susceptible de se présenter dans le milieu naturel; l'administration de la matière d'essai dans le régime alimentaire est à privilégier (USEPA, 1996i). La durée de l'essai, qui peut aller de 8 jours à  $\geq 30$  jours, est fonction de l'espèce hôte et de son stade biologique, de même que du type de micro-organisme à l'étude. Les paramètres biologiques devraient inclure la survie (mortalité) et les symptômes de pathologie.

USEPA (1996j) renferme peu d'indications quant aux procédures et conditions applicables aux essais menés avec un AAM sur des abeilles domestiques. En ce qui a trait à l'âge des organismes d'essai, le document indique seulement qu'il convient d'inclure des larves d'abeilles s'il est prévu que l'AAM aura un effet sur ce stade biologique. On peut aussi lire dans ce

document que les abeilles domestiques doivent être exposées par voie orale à l'AAM s'il est prévu que la voie d'exposition à ce dernier sera alimentaire ou que ses particules, d'une taille assimilable à celle du pollen, risquent d'être transportées à la ruche. Selon le document, il pourrait être nécessaire de mener des essais dans une ruche. Les abeilles témoins et celles traitées devraient faire l'objet d'observations pendant au moins 30 jours après l'exposition (USEPA, 1996j). Aucune précision n'est donnée quant aux paramètres biologiques applicables aux essais sur des abeilles domestiques.

La partie 9.5 de ARLA (2001) renferme des indications semblables à celles que l'on trouve dans USEPA (1996c) pour les essais visant à mesurer les effets d'AAM et de leur PC sur des insectes terrestres. La partie 9.6 de ce même document fait brièvement état d'essais sur des invertébrés autres que les arthropodes (p. ex., les vers de terre). D'après l'ARLA (Santé Canada), il faut porter une attention particulière aux insectes établis dans l'écozone ou les écozones où l'on compte utiliser l'agent microbien, de même qu'aux espèces « utiles » ayant une grande importance écologique ou économique, comme l'abeille domestique. L'ARLA appuie la position de l'USEPA (1996i) selon laquelle le mode d'exposition des organismes hôtes devrait correspondre à celui le plus susceptible de se présenter dans le milieu naturel, le régime alimentaire constituant le principal mode d'exposition. Elle recommande en outre de mener les essais sur les stades biologiques les plus susceptibles d'être exposés ou les plus vulnérables. La mortalité et les signes de pathologie devraient constituer les paramètres ultimes.

Des laboratoires privés des États-Unis ont mené un nombre considérable d'essais sur les effets de substances microbiennes (le plus souvent des AAM ou leur PC) sur des invertébrés terrestres; ils ont utilisé, comme guides généraux, les lignes directrices de la série 885 de l'USEPA sur les insectes non visés (USEPA 1996i) et les abeilles domestiques (USEPA, 1996j). Ces laboratoires ont élaboré et appliqué des modes opératoires normalisés pour les essais sur diverses espèces d'insectes, dont des abeilles domestiques, des guêpes parasites, des coccinelles convergentes, des chrysopes vertes et des grillons.

En réponse à un questionnaire non officiel (v. § 8.8), trois laboratoires des États-Unis ont indiqué que 22 essais étalés sur 2–30 jours avaient été effectués

sur des abeilles domestiques adultes exposées à des AAM ou à des produits microbiens. Vingt de ces essais portaient sur des bactéries et deux sur des champignons. La plupart (68 %) des essais étaient à concentrations multiples. Dans 36 % des essais, on a détecté des effets pathogènes et/ou toxiques. Au total, 5 % des essais comportaient un témoin microbien positif, 9 % un témoin sur filtrat stérile, 59 % un témoin non infectieux et 18 % un témoin chimique positif. La ou les concentrations microbiennes auxquelles les abeilles domestiques ont été exposées n'ont pas été établies, et l'on n'a procédé à aucune mesure de l'infectivité.

En réponse à ce même questionnaire, la division des pesticides microbiens de l'USEPA a indiqué qu'elle disposait de données sur ~87 essais portant sur les effets d'AAM ou de PC sur des abeilles domestiques et que tous avaient été menés conformément à USEPA (1996j). Sur ce nombre, ~60 visaient des bactéries, ~6 des virus, ~20 des champignons et le dernier un protozoaire. Les essais duraient 15 jours ou prenaient fin lorsque la mortalité des abeilles des témoins négatifs atteignait 20 %. Il s'agissait dans tous les cas d'essais à concentration unique. Seulement ~2 % des essais ont mis en lumière des effets pathogènes et/ou toxiques. Au total, ~2 % des essais comportaient un témoin sur filtrat stérile, ~2 % un témoin non infectieux et ~3 % un témoin chimique positif; aucun n'incluait de témoin microbien positif. L'infectivité n'a été mesurée dans aucun cas, tandis que les concentrations microbiennes auxquelles les abeilles étaient exposées ont été établies dans <23 % des essais.

Dans les dossiers qu'elle a examinés pour répondre au questionnaire de 2002, la division des pesticides microbiens de l'USEPA n'a relevé aucunes données relatives à des essais sur des vers de terre exposés à des AAM ou à leur PC. Pour leur part, les laboratoires privés des États-Unis ont indiqué que 15 essais (12 avec des bactéries, 1 avec un virus et 2 avec des champignons) avaient porté sur des vers de terre exposés à des substances microbiennes. La grande majorité (87 %) de ces études de laboratoire, le plus souvent étalées sur 14 jours, consistaient en essais à concentrations multiples. Aucune n'a mis en lumière des effets pathogènes et/ou toxiques. Au total, ~7 % des essais comportaient un témoin sur filtrat stérile et un témoin non infectieux; aucun ne prévoyait de témoin microbien positif, tandis que 40 % incluait un témoin chimique positif. On n'a

procédé à aucune mesure de l'infectivité, et la ou les concentrations microbiennes auxquelles les vers de terre ont été exposés n'ont pas été établies.

### **13.2 Méthodes d'essai biologique recommandées**

#### **13.2.1 Abeilles domestiques**

À l'heure actuelle, aucun essai de pathogénicité et/ou de toxicité de nouvelles substances microbiennes pour l'abeille domestique *A. mellifera* ou d'autres espèces d'insectes phytophiles (c.-à-d. des insectes pollinisateurs ou foliaires) ne peut être recommandé en tant que méthode d'essai biologique du fait qu'aucune méthode de ce type n'a été normalisée ni éprouvée à cette fin. L'USEPA a publié des lignes directrices portant sur un essai de laboratoire (durée de  $\geq 30$  jours) servant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'AAM sur des abeilles domestiques (USEPA, 1996j), mais celles-ci ne renferment aucune directive faisant autorité quant aux procédures et conditions convenant à un tel essai. L'agence se livre toutefois à des études de recherche afin de mettre au point une méthode d'essai normalisée qui permettra de mesurer en laboratoire les effets écologiques de substances microbiennes sur des abeilles domestiques [Z. Vaituzis et R. Rose, communication personnelle, Microbial Pesticides Branch, Biopesticides and Pollution Prevention Division, USEPA, Washington, DC (2003)]. Il y a plusieurs raisons pour lesquelles l'abeille domestique est à privilégier en tant qu'organisme hôte : cette espèce bénéfique a une importance écologique et économique; elle est répandue au Canada et ailleurs dans le monde; il a été établi qu'elle est vulnérable aux micro-organismes infectieux et aux produits chimiques toxiques; il est recommandé de l'utiliser pour mesurer la pathogénicité et/ou la toxicité de nouvelles substances microbiennes pour des invertébrés terrestres phytophiles (USEPA, 1996j; EC et SC, 2001; ARLA, 2001). En conséquence, il est justifié de consacrer des efforts à la mise au point d'une méthode d'essai biologique normalisée convenant à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques de substances microbiennes sur l'abeille domestique dans des conditions de laboratoire contrôlées. Les responsables des essais devraient envisager d'appliquer une telle méthode (il peut y en avoir plus d'une), lorsqu'elle deviendra disponible, à la mesure des effets nocifs de nouvelles substances microbiennes sur des abeilles domestiques.

### 13.2.2 Vers de terre

La méthode d'essai biologique que l'on recommande d'utiliser dans le cas d'invertébrés terrestres endogés consiste en un essai de 56 jours (8 semaines) sur *Eisenia andrei*. Cette méthode, qui a été normalisée et publiée par Environnement Canada (2004b) et qui peut servir à diverses fins, a été choisie pour les raisons suivantes : l'importance écologique des vers de terre dans le maintien de la structure du sol et dans le cycle des nutriments; la sensibilité des vers aux contaminants présents dans le sol; l'utilisation généralisée (à l'échelle internationale) de *E. andrei* et de son espèce jumelle *E. fetida* comme organismes hôtes dans les essais de laboratoire conçus pour mesurer la survie, la reproduction, le développement et la croissance de vers de terre exposés à long terme à un sol contaminé (USEPA, 1996hh; ISO, 1998; ASTM, 2000o; OCDE, 2000c; EC, 2004b).

Le tableau 11 résume les procédures et conditions applicables à un essai de 56 jours relatif aux effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne sur *E. andrei*. Il s'agit d'une adaptation de la méthode d'essai élaborée par Environnement Canada (2004b) pour la mesure des effets à long terme d'un sol contaminé sur la survie et la reproduction de vers de terre adultes, de même que sur le développement, la croissance et la survie de leurs descendants. L'essai décrit ici fait appel à des vers de terre élevés en laboratoire. Lors de la mise en route de l'essai, on transfère deux vers adultes dans chacun des bocaux en verre de 500 mL (10 bocaux de répétition par traitement) renfermant une quantité mesurée (masse humide) équivalant à ~350 mL du sol d'essai ou du sol non contaminé (témoin négatif).

Le taux de survie des vers adultes des groupes de répétition de chaque traitement est établi après une exposition de 28 jours. On doit examiner soigneusement chaque ver ayant survécu afin de déterminer s'il présente un aspect et/ou un comportement atypiques, et ce, avant de l'éliminer. L'essai se poursuit pendant 28 autres jours sur les descendants des organismes d'essai. À la fin de l'essai de 56 jours, il faut dénombrer les vers juvéniles vivants pour chaque répétition et chaque traitement, puis on compare les moyennes par traitement. Encore une fois, on doit examiner soigneusement les vers ayant survécu afin de déterminer s'ils présentent un aspect et/ou un comportement atypiques. La masse sèche de chaque juvénile ayant survécu est établie à la fin du

traitement pour chaque répétition, puis on compare les moyennes par traitement.

À moins d'indication contraire, les procédures et conditions décrites ici en ce qui a trait à l'élevage et à la manipulation des vers ainsi qu'au déroulement des essais sont tirées de EC (2004b). Chaque essai doit comporter un témoin négatif (EC, 2004b). Il faut aussi utiliser un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif) dans le cadre de l'essai (ou parallèlement à celui-ci). Il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile (v. section 4) est facultatif, mais recommandé, tout comme la mesure de l'infectivité (v. section 5). Les spécifications propres aux essais à concentration unique (§ 3.3.1) ou à concentrations multiples (§3.3.2) sont résumées au tableau 11. Dans un essai à concentration unique, les vers de terre sont exposés à la matière d'essai mélangée au sol et aux aliments d'essai; si l'on procède à un essai à concentrations multiples, on devrait mesurer séparément les effets de chacun de ces modes d'exposition (v. § 3.2). Il convient de se conformer aux indications que renferment les sous-sections 3.4.3 et 3.4.4 sur le mélange et l'administration de la matière d'essai dans le sol et dans les aliments, respectivement. La portion de la matière d'essai à sa CDM (v. § 3.3.1) qui est administrée dans le sol doit être mélangée à un échantillon de sol *non contaminé* préparé en laboratoire (artificiel) ou prélevé sur le terrain. Cette administration de la matière d'essai dans le sol a lieu une seule fois, juste avant le transfert des vers de terre dans les enceintes expérimentales. La portion de la matière d'essai à sa CDM (§ 3.3.1) qui est administrée dans les aliments doit être mélangée à chaque lot d'aliments fraîchement préparé immédiatement avant d'être distribué dans les enceintes expérimentales de chaque traitement.

La distribution des aliments a lieu les jours 0, 14, 28 et 42 seulement (v. tableau 11; EC, 2004b). Il faut procéder de la même façon pour le traitement témoin négatif et tout autre témoin. En d'autres termes, on utilise la même quantité d'aliments non contaminés seulement (dans le cas du témoin négatif) ou une quantité et une concentration identiques (c.-à-d. la CDM) de la matière d'essai modifiée dont on a besoin pour le témoin sur filtrat stérile ou le témoin non infectieux (v. section 4).

**Tableau 11 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 56 jours sur des vers de terre (*Eisenia andrei*)**

**Essai universel**

Méthode d'essai	— Conforme à l'essai sur les effets que peut avoir, sur la survie, la reproduction et la croissance de <i>E. andrei</i> , une exposition prolongée à un sol contaminé, décrit dans EC (2004b) : <i>Méthode d'essai biologique : essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre Eisenia andrei, Eisenia fetida ou Lumbricus terrestris</i> .
Type d'essai	— Mesure des effets nocifs sur la survie, la reproduction et la croissance de vers de terre présents dans le sol.
Durée de l'essai	— 56 jours (8 semaines).
Organismes d'essai	— <i>E. andrei</i> d'élevage; adultes ayant atteint la maturité sexuelle et dotés d'un clitellum; poids frais individuel de 250–600 mg; choisir des vers dont les poids frais sont les plus semblables possible.
Sol	— Naturel ou artificiel (préparé en laboratoire).
Enceinte expérimentale	— Bocal en verre de 500 mL; on recommande d'utiliser comme couvercle un papier d'aluminium perforé maintenu en place à l'aide d'un anneau vissé.
Quantité de sol par enceinte expérimentale	— Masse humide identique, équivalant à un volume de ~350 mL; masse sèche de ~200 g dans le cas d'un sol artificiel.
Teneur en humidité du sol d'essai	— Si le sol est prélevé sur le terrain, l'hydrater au besoin, jusqu'à l'obtention d'une texture granulaire homogène; s'il s'agit d'un sol artificiel, l'hydrater à ~70 % de sa capacité de rétention d'eau.
Nombre de vers par enceinte expérimentale	— 2
Température	— Moyenne quotidienne : $20 \pm 2$ °C; instantanée : $20 \pm 3$ °C.
Éclairage	— Incandescent ou fluorescent; intensité lumineuse de 400–800 lux à la surface du sol de l'enceinte expérimentale; photopériode fixe (p. ex., 16 h de clarté et 8 h d'obscurité, ou 12 h de clarté et 12 h d'obscurité).
Alimentation	— Gruau cuit, à raison de 5 mL (ou 1 cuillère à thé) par enceinte expérimentale, les jours 0, 14, 28 et 42 seulement; les aliments sont placés dans une petite dépression au centre du sol de chaque enceinte.
Témoins	— Chaque essai doit comporter un témoin négatif; il faut déterminer la sensibilité des organismes d'essai à un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
Modes d'exposition	— Matière d'essai mélangée au sol et aux aliments pour un essai à concentration unique; matière d'essai mélangée soit au sol, soit aux aliments pour un essai à concentrations multiples.
CDM pour le sol	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/g de sol (masse sèche), ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans le sol de l'environnement terrestre (v. § 3.3.1.5).
CDM pour les aliments	— La concentration microbienne doit équivaloir à 100 fois la concentration maximale précisée par le déclarant pour le mélange final en cuve d'un produit microbien (v. § 3.3.1.7).
Essai d'infectivité	— Facultatif – la décision à cet égard se fonde sur la teneur mesurée en nouvelle substance microbienne d'homogénats d'organismes entiers de vers de terre de chaque traitement, au cours et/ou au terme de l'essai.
Mesures	— Mesure de la température de l'installation d'essai, maximum/minimum quotidiens ou en continu; teneur en humidité (%), conductivité et pH, au début et à la fin de l'essai pour au moins une répétition de chaque traitement; si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne dans le sol de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai au moins.

- Observations — Nombre total d'adultes vivants de chaque enceinte expérimentale les jours 0 et 28; nombre de juvéniles vivants de chaque enceinte le jour 56; symptômes de pathologie (p. ex., blessures ouvertes) ou comportement anormal distinct (p. ex., léthargie) des vers de chaque enceinte.
- Paramètres biologiques — Pour chaque répétition (enceinte expérimentale) : nombre total d'adultes ayant survécu le jour 28; masse sèche totale et nombre de juvéniles vivants le jour 56; nombre d'adultes ayant survécu et dont l'aspect et/ou le comportement sont atypiques le jour 28; nombre de juvéniles ayant survécu et dont l'aspect et/ou le comportement sont atypiques le jour 56.
- Validité de l'essai — Essai invalide dans les cas suivants : survie moyenne des adultes du témoin négatif de <90 %; taux moyen de reproduction des adultes du témoin négatif de <3 juvéniles vivants par adulte; masse sèche moyenne de chaque juvénile vivant du témoin négatif de <2,0 mg à la fin de l'essai.

### ***Essai à concentration unique***

- Nombre de traitements — Au moins deux (CDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
- Nombre de répétitions — Dix par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
- Nombre de vers par traitement — 20
- Paramètres statistiques — Pour chaque traitement : pourcentage d'adultes ayant survécu le jour 28; pourcentage d'adultes ayant survécu et dont l'aspect et/ou le comportement sont atypiques le jour 28; nombre moyen ( $\pm$  ET) de juvéniles vivants le jour 56; masse sèche moyenne ( $\pm$  ET) des juvéniles vivants le jour 56; pourcentage de juvéniles ayant survécu et dont l'aspect et/ou le comportement sont atypiques le jour 56.
- Comparaisons statistiques — CDM et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie, dans le pourcentage d'adultes dont l'aspect et/ou le comportement sont atypiques le jour 28 et dans le nombre, l'aspect et/ou le comportement et la masse sèche des juvéniles ayant survécu le jour 56; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

- Nombre de concentrations (ou nombre de traitements) — Au moins sept, dont la CDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
- Nombre de répétitions — Dix par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
- Nombre de vers par traitement — 20
- Paramètres statistiques — Pour chaque traitement : pourcentage de survie des adultes le jour 28; pourcentage d'adultes ayant survécu et dont l'aspect et/ou le comportement sont atypiques le jour 28; nombre moyen ( $\pm$  ET) de juvéniles vivants le jour 56; masse sèche moyenne ( $\pm$  ET) des juvéniles vivants le jour 56; pourcentage de juvéniles ayant survécu et dont l'aspect et/ou le comportement sont atypiques le jour 56; si les données le permettent,  $CL_{50}$  28 jours pour les adultes,  $CE_{50}$  28 jours en regard des adultes dont l'aspect et/ou le comportement sont atypiques,  $CE_{50}$  56 jours en regard des juvéniles dont l'aspect et/ou le comportement sont atypiques,  $CI_{25}$  56 jours en regard du nombre de juvéniles,  $CI_{25}$  56 jours en regard de la masse sèche des juvéniles.
- Comparaisons statistiques — Concentrations expérimentales et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie, dans le pourcentage d'adultes dont l'aspect et/ou le comportement sont atypiques le jour 28 et dans le nombre, l'aspect et/ou le comportement et la masse sèche des juvéniles ayant survécu le jour 56; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.
-

Si l'on procède à un essai à concentrations multiples, on devrait mesurer séparément les effets de chacun de ces modes d'exposition, comme il est indiqué au tableau 11 (v. § 3.2). La décision quant au mode à privilégier dans un essai à concentrations multiples dépend de la façon dont la nouvelle substance microbienne sera appliquée dans l'environnement (p. ex., sous forme de pulvérisation aérienne ou de solide déposé sur le sol ou mélangé à celui-ci) et de la voie ou des voies par lesquelles la substance viendra vraisemblablement en contact avec le sol et les vers de terre qu'il renferme. Dans chaque essai à concentrations multiples, il faut utiliser la matière d'essai à sa CDM et à des concentrations plus faibles pour chaque mode d'exposition; il faut aussi prévoir un témoin négatif et, selon le plan de l'étude, un ou plus d'un autre témoin (v. § 3.3.2 et section 4). La méthode d'essai biologique décrite ici exige au moins sept concentrations expérimentales ainsi qu'un témoin ou plus; on pourrait envisager de porter le nombre de concentrations à dix (EC, 2004b) afin d'accroître la possibilité de mesurer chacun des paramètres statistiques prévus dans l'essai à concentrations multiples (v. tableau 11).

Les paramètres biologiques inclus dans la méthode d'essai sont fondés sur les observations suivantes, qui visent chaque traitement :

- (i) nombre de vers adultes vivants de chaque enceinte expérimentale le jour 28;
- (ii) nombre de vers adultes vivants de chaque enceinte expérimentale, présentant un aspect et/ou un comportement atypiques le jour 28;
- (iii) nombre de vers juvéniles vivants de chaque enceinte expérimentale le jour 56;
- (iv) nombre de vers juvéniles vivants de chaque enceinte expérimentale, présentant un aspect et/ou un comportement atypiques le jour 56;
- (v) masse sèche des vers juvéniles ayant survécu dans chaque enceinte expérimentale.

Le tableau 11 indique les paramètres statistiques applicables aux essais à concentration unique et à concentrations multiples, de même que les comparaisons statistiques à établir pour chaque traitement.

Dans le cas d'un essai à concentration unique, les paramètres statistiques à mesurer pour chaque traitement au terme de l'essai de 56 jours sont les suivants :

- a) pourcentage de survie des vers adultes le jour 28;
- b) pourcentage de vers adultes présentant un aspect et/ou un comportement atypiques le jour 28;
- c) nombre de vers juvéniles vivants le jour 56;
- d) pourcentage de vers juvéniles vivants présentant un aspect et/ou un comportement atypiques le jour 56;
- e) masse sèche moyenne des vers juvéniles ayant survécu le jour 56.

Une fois établies pour la CDM et pour tout traitement témoin, les valeurs respectives de ces paramètres devraient être comparées à celles établies pour le témoin négatif, à l'aide d'un test statistique permettant des comparaisons par paire, comme le *test de Student*. Il convient de consulter les méthodes statistiques que renferme le guide des essais d'écotoxicité d'Environnement Canada (2004d) pour déterminer les paramètres à mesurer ainsi que pour choisir les méthodes à appliquer.

Les paramètres statistiques décrits ci-dessus s'appliquent également aux essais à concentrations multiples. Si les données le permettent (v. § 3.3.2), la  $CL_{50}$  28 jours pour les vers de terre adultes exposés à la matière d'essai devrait être établie, de même que la pente de sa courbe et ses limites de confiance de 95 %. Les  $CE_{50}$  28 jours et 56 jours — et leurs limites de confiance de 95 % — pour les vers de terre adultes et leur descendance, respectivement, devraient être calculées (si les données le permettent) à partir du nombre de vers de chaque traitement présentant un aspect et/ou un comportement atypiques. On devrait aussi tenter de calculer la  $CI_{25}$  56 jours (et ses limites de confiance de 95 %) en regard du nombre de vers juvéniles produits dans chaque traitement, de même qu'en regard de la masse sèche de ceux-ci. EC (2004d) renferme des conseils sur les logiciels (et leur application) à utiliser pour déterminer chacun de ces paramètres statistiques.



### 13.2.3 Collemboles

La méthode d'essai biologique que l'on recommande d'utiliser dans le cas d'invertébrés terrestres endogés consiste en un essai de 28 jours sur le collembole *Folsomia candida*<sup>79</sup>. Cette méthode, qui a été normalisée et publiée par Environnement Canada (2004c) et qui peut servir à diverses fins, a été choisie pour les raisons suivantes : le niveau trophique clé du collembole dans la chaîne alimentaire pédologique – il consomme des champignons, des détritiques et des nématodes et il est un important prédateur; l'abondance de *F. candida* dans les sols du Canada méridional; la facilité d'élevage en laboratoire; un cycle biologique relativement court; une sensibilité aux contaminants du sol; une utilisation généralisée (à l'échelle internationale) dans les essais de laboratoire conçus pour mesurer les effets de contaminants de l'environnement sur la survie et le succès de reproduction de l'espèce (ISO, 1999b; Becker-van Slooten et coll., 2003; EC, 2004c).

Le tableau 12 résume les procédures et conditions applicables à un essai de 28 jours relatif aux effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne sur *F. candida*. Il s'agit d'une adaptation de la méthode d'essai élaborée par Environnement Canada (2004c) pour la mesure des effets à long terme d'un sol contaminé sur la survie et la reproduction de collemboles (invertébrés endogés). L'essai décrit ici fait appel à des collemboles *F. candida* élevés en laboratoire. Lors de la mise en route de l'essai, on transfère 10 juvéniles (âgés de 10–12 jours) dans chacun des béciers en verre de 100 mL (5 béciers de répétition par traitement) renfermant une quantité mesurée (30 g, masse humide) du sol d'essai ou du sol non contaminé (témoin négatif). Après une exposition de 28 jours, on établit et compare, pour les groupes de répétition, le taux de survie des collemboles de la première génération (maintenant adultes) de chaque traitement; on procède de même pour leurs descendants (c.-à-d. les juvéniles de la deuxième génération).

À moins d'indication contraire, les procédures et conditions décrites ici en ce qui a trait à l'élevage et à

<sup>79</sup> *F. candida* est un invertébré du sol, dépourvu d'ailes, de l'ordre des collemboles (arthropodes, hexapodes). Cette espèce d'invertébré parthénogénétique se caractérise par l'absence d'yeux et de pigmentation; elle fréquente les sols forestiers et agricoles des régions tempérées (méridionales) du Canada et d'autres pays. Elle se reproduit rapidement et facilement en laboratoire. La taille des adultes peut atteindre ~2 mm (Becker-van Slooten et coll., 2003).

la manipulation des vers ainsi qu'au déroulement des essais sont tirées de EC (2004c). Chaque essai doit comporter un témoin négatif. Conformément à EC (2004c), il faut utiliser un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif) dans le cadre de l'essai (ou parallèlement à celui-ci). Il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile (v. section 4) est facultatif, mais recommandé, tout comme la mesure de l'infectivité (v. section 5). Les spécifications propres aux essais à concentration unique (§ 3.3.1) ou à concentrations multiples (§3.3.2) sont résumées au tableau 12. La matière d'essai mélangée au sol d'essai constitue le mode d'exposition des collemboles. Il convient de se conformer aux indications que renferme la sous-section 3.4.3 sur le mélange et l'administration de la matière d'essai dans le sol. La portion de la matière d'essai à sa CDM (v. § 3.3.1) qui est administrée dans le sol doit être mélangée à un échantillon de sol *non contaminé* préparé en laboratoire (artificiel) ou prélevé sur le terrain; s'il s'agit d'un essai à concentrations multiples, on utilisera, outre la CDM, des concentrations plus faibles (v. § 3.3.2). Cette administration de la matière d'essai dans le sol a lieu une seule fois, juste avant le transfert des collemboles dans les enceintes expérimentales.

La distribution des aliments a lieu les jours 0 et 14 seulement (v. tableau 12; EC, 2004c). Il faut procéder de la même façon pour le traitement témoin négatif et tout autre témoin. En d'autres termes, on utilise la même quantité d'aliments non contaminés seulement (dans le cas du témoin négatif) ou une quantité et une concentration identiques (c.-à-d. la CDM) de la matière d'essai modifiée dont on a besoin pour le témoin sur filtrat stérile ou le témoin non infectieux (v. section 4).

Dans chaque essai à concentrations multiples, il faut utiliser la matière d'essai à sa CDM et à des concentrations plus faibles; il faut aussi prévoir un témoin négatif et, selon le plan de l'étude, un ou plus d'un autre témoin (v. § 3.3.2 et section 4). La méthode d'essai biologique décrite ici exige au moins sept concentrations expérimentales ainsi qu'un témoin ou plus; on pourrait envisager de porter le nombre de concentrations à dix (EC, 2004c) afin d'accroître la possibilité de mesurer chacun des paramètres statistiques prévus dans l'essai à concentrations multiples (v. tableau 12).

**Tableau 12 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 28 jours sur des collemboles (*Folsomia candida*)**

**Essai universel**

Méthode d'essai	— Conforme à l'essai de 28 jours sur les effets que peut avoir un sol contaminé sur la survie et la reproduction de <i>F. candida</i> , décrit dans EC (2004c) : <i>Méthode d'essai biologique : essai visant à mesurer la survie et la reproduction de collemboles exposés à des contaminants présents dans le sol</i> (titre provisoire).
Type d'essai	— Mesure des effets nocifs sur la survie et la reproduction de <i>F. candida</i> présents dans le sol.
Durée de l'essai	— 28 jours.
Organismes d'essai	— Juvéniles d'élevage âgés de 10–12 jours.
Sol	— Naturel ou artificiel (préparé en laboratoire).
Enceinte expérimentale	— Bêcher ou bocal en verre d'une capacité de 100 mL et d'un diamètre de ~5 cm, muni d'un couvercle approprié.
Quantité de sol par enceinte expérimentale	— 30 g (masse humide).
Teneur en humidité du sol d'essai	— Si le sol est prélevé sur le terrain, l'hydrater et le mélanger, au besoin, jusqu'à l'obtention d'une texture granulaire homogène; s'il s'agit d'un sol artificiel, l'hydrater à ~70 % de sa capacité de rétention d'eau.
Nombre d'organismes par enceinte	— 10
Température	— Moyenne quotidienne de $20 \pm 2$ °C.
Éclairage	— Incandescent ou fluorescent; intensité lumineuse de 400–800 lux à la surface du sol de l'enceinte expérimentale; photopériode fixe (p. ex., 16 h de clarté et 8 h d'obscurité, ou 12 h de clarté et 12 h d'obscurité).
Alimentation	— Levure desséchée à raison de ~2 mg par enceinte expérimentale, les jours 0 et 14 seulement.
Témoins	— Chaque essai doit comporter un témoin négatif; il faut déterminer la sensibilité des organismes d'essai à un toxique de référence (c.-à-d. un témoin chimique positif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
Mode d'exposition	— Matière d'essai mélangée au sol.
CDM pour le sol	— La plus élevée ou la plus réalisable des deux valeurs suivantes : $10^6$ unités microbiennes/g de sol (masse sèche), ou 1000 fois la concentration microbienne prévue dans le sol de l'environnement terrestre (v. § 3.3.1.5).
Essai d'infectivité	— Aucun (en raison de la biomasse limitée des organismes d'essai).
Mesures	— Mesure de la température de l'installation d'essai, maximum/minimum quotidiens ou en continu; teneur en humidité (%), conductivité et pH, au début et à la fin de l'essai pour au moins une répétition de chaque traitement; si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne dans le sol de chaque traitement, y compris du ou des témoins, au début et à la fin de l'essai au moins.
Observations	— Nombre total d'adultes vivants (première génération) de chaque enceinte expérimentale les jours 0 et 28; nombre de juvéniles vivants (deuxième génération) de chaque enceinte expérimentale le jour 28.

- Paramètres biologiques — Pour chaque répétition (enceinte expérimentale) : nombre total d'adultes (première génération) ayant survécu, le jour 28; nombre total de juvéniles (deuxième génération) le jour 28.
- Validité de l'essai — Essai invalide si la survie moyenne des adultes (première génération) du témoin négatif est de <70 % le jour 28; essai invalide si le taux moyen de reproduction des adultes du témoin négatif est de <10 juvéniles par adulte.

### ***Essai à concentration unique***

- Nombre de traitements — Au moins deux (CDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
- Nombre de répétitions — Cinq par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
- Nombre de collemboles par traitement — 50
- Paramètres statistiques — Pour chaque traitement : pourcentage de survie des adultes (première génération) le jour 28; nombre moyen ( $\pm$  ET) de juvéniles (deuxième génération) le jour 28.
- Comparaisons statistiques — CDM et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie des adultes (première génération) et dans le nombre de juvéniles (deuxième génération) le jour 28; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

- Nombre de concentrations (ou nombre de traitements) — Au moins sept, dont la CDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
- Nombre de répétitions — Cinq par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
- Nombre de collemboles par traitement — 50
- Paramètres statistiques — Pour chaque traitement : pourcentage de survie des adultes le jour 28, nombre moyen ( $\pm$  ET) de juvéniles le jour 28; si les données le permettent,  $CL_{50}$  28 jours pour les adultes et  $CI_{25}$  28 jours en regard du nombre de juvéniles produits.
- Comparaisons statistiques — Concentrations expérimentales et témoin négatif, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie des adultes et dans le nombre de juvéniles le jour 28; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.
-

Les paramètres biologiques inclus dans la méthode d'essai sont fondés sur les observations suivantes, qui visent chaque traitement :

- (i) nombre de collemboles vivants de la première génération (devenus adultes) de chaque enceinte expérimentale le jour 28;
- (ii) nombre de collemboles de la deuxième génération (juvéniles) de chaque enceinte expérimentale le jour 28.

Ce dernier paramètre constitue une mesure du taux de reproduction des collemboles de la première génération, dans des conditions d'essai définies. Le tableau 12 indique les paramètres statistiques applicables aux essais à concentration unique et à concentrations multiples, de même que les comparaisons statistiques à établir pour chaque traitement.

Dans le cas d'un essai à concentration unique, les paramètres statistiques à mesurer pour chaque traitement au terme de l'essai de 28 jours sont les suivants :

- a) pourcentage de survie des collemboles de la première génération le jour 28;
- b) nombre moyen de collemboles de la deuxième génération (juvéniles) le jour 28.

Une fois établies pour la CDM et pour tout traitement témoin, les valeurs respectives de ces paramètres devraient être comparées à celles établies pour le témoin négatif, à l'aide d'un test statistique permettant des comparaisons par paire, comme le *test de Student*. Il convient de consulter les méthodes statistiques que renferme le guide des essais d'écotoxicité d'Environnement Canada (2004d) pour déterminer les paramètres à mesurer ainsi que pour choisir les méthodes à appliquer.

Les paramètres statistiques décrits ci-dessus s'appliquent également aux essais à concentrations multiples. Si les données le permettent (v. § 3.3.2), la  $CL_{50}$  28 jours pour les collemboles de la première génération exposés à la matière d'essai devrait être établie, de même que la pente de sa courbe et ses limites de confiance de 95 %. On devrait aussi tenter de calculer la  $CL_{25}$  28 jours (et ses limites de confiance de 95%) en regard du nombre de

collemboles juvéniles produits dans chaque traitement. EC (2004d) renferme des conseils sur les logiciels (et leur application) à utiliser pour déterminer chacun de ces paramètres statistiques.

### 13.3 Autres méthodes ou procédures

#### 13.3.1 Essais sur des invertébrés terrestres phytophiles

Entre 1989 et 1992, l'Environmental Research Laboratory de l'USEPA, situé à Corvallis, en Oregon, a établi une série de protocoles à appliquer lors d'essais visant à mesurer les effets de pathogènes microbiens sur des insectes et acariens bénéfiques non visés. Ces protocoles incluent des méthodes d'essai de pathogénicité et de *virulence* de champignons pour l'acarien prédateur *Metaseiulus occidentalis* (Sewall et Lighthart, 1989), la guêpe parasite *Trichogramma pretiosum* (Sewall et Lighthart, 1990), la chrysope verte (*C. carnea*) (Donegan et Lighthart, 1991) et la coccinelle convergente (*H. convergens*) (James et Lighthart, 1992). Il existe aussi des essais de pathogénicité et de virulence de bactéries pour la coccinelle convergente (James et Lighthart, 1990). Dans ces essais, la procédure d'exposition consiste généralement à tremper les insectes dans différentes concentrations de la matière d'essai (application par immersion); au terme des observations étalées sur les 6–10 jours qui suivent, on établit les  $CL_{50}$  (si les données le permettent). Ces essais ne sont pas cités dans les lignes directrices de la série 885 de l'USEPA sur les insectes non visés (USEPA, 1996i). Ils fournissent néanmoins des directives et approches utiles pour les essais visant à mesurer les effets de pathogènes microbiens sur ces espèces d'insectes et d'acariens. On pourrait envisager d'utiliser un ou plusieurs de ces protocoles dans les essais de pathogénicité et/ou de toxicité d'une nouvelle substance microbienne pour des invertébrés terrestres phytophiles.

Fisher et Briggs (1992) ont examiné divers éléments associés aux essais de laboratoire sur les effets d'AAM sur des insectes non visés, notamment le choix des organismes d'essai (hôtes), les divers modes d'exposition, la quantification des concentrations expérimentales, la durée des essais et les paramètres à mesurer. Ils décrivent brièvement les démarches entourant la recherche et les méthodes d'essai (non normalisées) permettant de mesurer les effets de micro-organismes sur des abeilles domestiques et d'autres espèces d'insectes non visées.

Ce document pourrait s'avérer utile lors du choix de la ou des méthodes d'essai sur des invertébrés terrestres exposés à une nouvelle substance microbienne donnée (v. § 8.6).

On trouve dans la documentation scientifique des rapports décrivant des essais de laboratoire au cours desquels on évalue, sur 12–14 jours, le taux de mortalité de groupes d'abeilles domestiques adultes exposées à des pathogènes microbiens. Ball et coll. (1994) ont acclimaté des groupes d'abeilles domestiques ayant atteint le stade de jeunes adultes (25 par cage) aux conditions de laboratoire pendant une semaine; les abeilles ont ensuite été exposées à un mycopesticide administré sous forme de vapeur. Les groupes témoins négatifs (6 répétitions de 25 abeilles/cage) affichaient un taux de mortalité de 7 % seulement au terme des 12 jours d'observation qui ont suivi. Butt et Goettel (2000) ont utilisé un cadre expérimental semblable à celui de Ball et coll. (1994). Ils n'ont pas signalé le taux de mortalité des abeilles des groupes témoins, mais ils ont observé un taux de mortalité de seulement 11 %, après 14 jours, chez les groupes d'abeilles adultes exposées à la concentration la plus faible, et des taux nettement supérieurs (jusqu'à 87 %) pour les concentrations plus élevées. Les études de recherche de Ball et coll. (1994) et de Butt et Goettel (2000) montrent que de tels plans d'expérience permettent d'atteindre des taux de mortalité peu élevés (p. ex.,  $\leq 10$  %) et acceptables chez les abeilles domestiques adultes des groupes témoins négatifs au cours d'essais de laboratoire de 12–14 jours<sup>80</sup>. Même si cette démarche n'a pas été appliquée sous forme de méthode d'essai biologique normalisée, elle semble prometteuse pour les essais de laboratoire visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne sur des abeilles domestiques ayant atteint le stade de jeunes adultes. Les responsables des essais qui souhaitent appliquer cette méthode devraient mener des essais préliminaires de 14 jours afin de s'assurer qu'ils peuvent maintenir la mortalité à un taux acceptable de  $\leq 10$  %. On pourrait également envisager et expérimenter, au cours des essais préliminaires, deux modes d'administration de la nouvelle substance microbienne à l'étude : celle-ci pourrait être mélangée aux aliments des groupes d'essai [p. ex., mélange dans une solution de saccharose à 50 %, conformément à OCDE (1998d)]

ou être appliquée sous forme de vapeur [p. ex., Ball et coll. (1994); Butt et Goettel (2000)].

Au nombre des lignes directrices applicables aux essais sur les effets écologiques, que l'USEPA (Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances) a publiées sous forme d'« ébauches publiques » dans sa série 850, on trouve deux documents (USEPA, 1996ii, 1996jj) qui décrivent les méthodes et procédures servant à mesurer la toxicité de pesticides et d'autres substances toxiques pour les abeilles domestiques. Les lignes directrices que renferment ces deux documents ne sont d'aucune utilité pour les essais sur les effets pathogènes de ces substances en raison d'une durée trop brève (c.-à-d. 24 h pour l'essai de toxicité aiguë par contact; 48 h pour l'essai de toxicité de résidus présents sur le feuillage). Les modes d'exposition prévus dans ces lignes directrices sont également moins appropriés du fait qu'ils diffèrent du mode d'administration par voie orale recommandé dans USEPA (1996j) pour un essai de 30 jours sur des abeilles domestiques exposées à un AAM. Par conséquent, ces lignes directrices (USEPA, 1996ii, 1996jj) ne sont pas acceptables pour la mesure de la pathogénicité et/ou de la toxicité de nouvelles substances microbiennes aux fins des déclarations.

L'OCDE a publié deux ensembles de lignes directrices normalisées pour mesurer les effets de substances chimiques sur des abeilles domestiques. Le premier document (OCDE, 1998d) prévoit l'exposition d'abeilles ouvrières adultes à une gamme de concentrations de la matière d'essai dispersée dans une solution de saccharose à 50 % pendant 3–4 h, après quoi la solution de saccharose seulement est donnée comme aliment pendant la durée de l'essai. Le deuxième (OCDE, 1998e) comporte l'application directe de la matière d'essai (sous forme de gouttelettes) sur le thorax des abeilles. Dans chaque cas, l'essai dure 48–96 h (OCDE, 1998d, 1998e), ce qui est trop bref pour un essai visant à mesurer les effets tant pathogènes que toxiques d'une matière d'essai sur des abeilles domestiques. Par conséquent, ces méthodes d'essai ne conviennent pas à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne aux fins des déclarations.

Hanley et coll. (2003) ont publié un article de recherche sur un essai de laboratoire ayant servi à démontrer les effets nocifs que pourrait avoir, sur des larves ou des nymphes d'abeilles domestiques, du

<sup>80</sup> Il convient d'utiliser des abeilles adultes nouvellement écloses (âgées de 24–48 h).

pollen alimentaire contaminé par des pesticides microbiens ou chimiques. D'après Z. Vaituzis [communication personnelle, Microbial Pesticides Branch, Biopesticides and Pollution Prevention Division, USEPA, Washington, DC (2003)], l'USEPA envisage l'utilisation de certains éléments de ce plan d'expérience — qui inclut notamment, comme paramètres biologiques, le taux de mortalité des larves et des nymphes de même que la réduction de la masse des nymphes — dans la mise au point d'un protocole normalisé convenant à la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques d'AAM sur des abeilles domestiques, conformément à USEPA (1996j).

### **13.3.2 Essais sur des invertébrés endogés**

La méthode d'essai recommandée à la sous-section 13.2 pour les vers de terre ressemble à celle

décrite dans ISO (1998) et dans OCDE (2000c). Ces deux méthodes prévoient des essais étalés sur 8 semaines (56 jours) et incluent des observations et des mesures relatives aux effets sur la reproduction des abeilles, de même que sur la survie, la croissance, l'aspect et le comportement des descendants (paramètres biologiques). L'ASTM a publié un guide des essais de toxicité du sol pour *Eisenia* sp. (ASTM, 2000o); ces essais sont moins longs (c.-à-d. 7–28 jours) et ne prévoient pas la mesure des effets sur la reproduction ou sur le développement et la survie des descendants exposés. Compte tenu de ces lacunes, on utilisera la méthode d'essai recommandée à la sous-section 13.2 plutôt que celle décrite dans ASTM (2000o) pour mesurer les effets de nouvelles substances microbiennes sur des vers de terre.

## Essais sur des vertébrés terrestres

### 14.1 Oiseaux

#### Repères

- *L'essai biologique normalisé que l'on recommande d'utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur des oiseaux consiste en un essai de 30 jours sur la survie, l'aspect et le comportement de jeunes canards colverts ou de jeunes colins de Virginie. Lors du choix de l'espèce à utiliser, on recommande de tenir compte de l'habitat et du régime alimentaire propres à chacune.*
- *L'essai est mené conformément à USEPA (1996k) si la nouvelle substance microbienne est administrée par voie orale (gavage) ou à USEPA (1996l) si elle est administrée par inhalation.*
- *Cette méthode d'essai biologique prévoit l'autopsie des oiseaux à la fin de l'essai en vue de détecter les changements macroscopiques dans les tissus ou les organes et, le cas échéant, les effets histologiques. L'infectivité doit être mesurée à la fin des essais si les méthodes d'analyse le permettent.*
- *Il existe des directives sur l'exécution d'essais visant à mesurer les effets chroniques (y compris ceux sur la reproduction) de nouvelles substances microbiennes sur les oiseaux (USEPA, 1996m); ces directives pourraient être appliquées, au besoin, si l'on se préoccupe des effets différés ou à long terme d'une nouvelle substance microbienne donnée.*

#### 14.1.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens

Douville (2001) a passé en revue les études de recherche publiées sur l'exposition de diverses espèces d'oiseaux à des micro-organismes (bactéries, virus, champignons et levures). Différentes espèces hôtes ont été utilisées dans ces études, dont le canard colvert (*Anas platyrhynchos*), le colin de Virginie (*Colinus virginianus*), la caille du Japon, des pigeons, le roselin familier, le carouge à épaulettes et la tourterelle triste. Les procédures et conditions, notamment le stade biologique, le mode d'exposition, la durée des essais et les paramètres biologiques, étaient variées et propres à chaque étude. Les modes d'exposition comprenaient l'administration de la matière d'essai par voie orale (gavage), par inhalation

et par injection (intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire). Les essais pouvaient durer entre 1 jour et 30 jours. La mortalité, la masse corporelle, les pathologies apparentes et l'histopathologie d'organes et de tissus choisis faisaient partie des paramètres biologiques.

En 1996, l'USEPA a publié trois documents renfermant des lignes directrices applicables aux essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques de pesticides microbiens sur des oiseaux (USEPA, 1996k,l,m). On peut résumer chacune des trois méthodes d'essai comme suit :

- essai de 30 jours au cours duquel des groupes de jeunes oiseaux (âgés de 14–24 jours) de la même espèce (le colin de Virginie et, séparément, le canard colvert et d'autres espèces insectivores) reçoivent une dose quotidienne de la matière d'essai par voie orale (gavage) pendant cinq jours consécutifs; on observe ensuite le taux de mortalité, la masse corporelle (chaque semaine), tout comportement atypique, de même que les pathologies macroscopiques et microscopiques à la fin de l'essai (USEPA, 1996k);
- essai de 30 jours au cours duquel des groupes de jeunes oiseaux (âgés de 14–28 jours) de la même espèce (de préférence, le colin de Virginie) reçoivent une ou plusieurs doses quotidiennes de la matière d'essai par inhalation (instillation nasale ou trachéale) pendant cinq jours consécutifs; on observe ensuite le taux de mortalité, tout comportement atypique, la masse corporelle (chaque semaine), de même que les pathologies macroscopiques et microscopiques à la fin de l'essai (USEPA, 1996l);
- un essai de toxicité chronique (pathogénicité et effets sur la reproduction) au cours duquel des oiseaux d'une espèce donnée (de préférence, le canard colvert ou le colin de Virginie) sont exposés à la matière d'essai dans leur régime alimentaire pendant  $\geq 10$  semaines avant la ponte et tout au long de la saison de la ponte; on procède ensuite à des observations (mortalité, comportement, autopsie à l'œil nu, nombre d'œufs

pondus, succès d'éclosion) pendant  $\geq 14$  jours après la dernière éclosion (USEPA, 1996m).

Les directives concernant la déclaration d'AAM ou de leur PC, publiées par l'ARLA (Santé Canada) en 2001, prévoient la conduite d'essais sur des oiseaux, dont un par voie orale et un autre par voie respiratoire, et ce, pour tous les pesticides microbiens. Selon ces directives, on devrait utiliser le canard colvert ou le colin de Virginie, de préférence. Il convient d'employer des jeunes (âgés de  $\sim 14$  jours) au commencement des essais. L'AAM doit être administré dans le tube digestif par gavage ou par intubation, et dans les voies respiratoires par instillation nasale ou trachéale<sup>81</sup>. Ces procédures sont conformes à celles prescrites dans USEPA (1996k,l). Selon les résultats obtenus et ceux d'autres essais (de toxicité aiguë), il pourrait être nécessaire de procéder à des essais additionnels [p. ex., conformément à USEPA (1996m)] (ARLA, 2001).

Dans sa réponse au questionnaire non officiel de 2002 (v. § 8.8), la division des pesticides microbiens de l'USEPA a indiqué qu'il existait des données sur  $\sim 87$  essais de 15–30 jours sur des colins de Virginie ou des canards colverts exposés à des AAM ou à leur PC, menés selon les lignes directrices prescrites dans USEPA (1996k,l). Sur ce nombre,  $\sim 60$  visaient des bactéries,  $\sim 6$  des virus,  $\sim 20$  des champignons et le dernier un protozoaire. Aucun de ces essais à concentration unique (CDM) n'a permis de détecter les effets pathogènes et/ou toxiques des AAM ou des PC à l'étude. Aucun ne comportait de témoin microbien positif, de témoin chimique positif ou de témoin sur filtrat stérile, tandis que  $\sim 28$  % incluaient un témoin non infectieux. On n'a procédé à aucune mesure de l'infectivité, mais la concentration microbienne à laquelle les oiseaux étaient exposés a été établie dans certains cas ( $< 23$  %).

Les trois laboratoires privés des États-Unis qui ont répondu au questionnaire de 2002 (v. § 8.8) ont mentionné avoir procédé à 41 essais (dont 34 avec des bactéries, 5 avec des virus et 2 avec des champignons) sur des oiseaux (canard colvert, colin

de Virginie ou coq domestique) exposés à des AAM ou à des produits microbiens. Ces essais de 28–30 jours, exécutés conformément à USEPA (1996k,l), consistaient pour la plupart en essais à concentrations multiples (98 %). On a détecté des effets pathogènes et/ou toxiques dans le cas de 5 %, seulement des matières d'essai. Aucun essai ne comportait de témoin microbien positif ou de témoin chimique positif, 7 % incluaient un témoin sur filtrat stérile et 73 % un témoin non infectieux. On a mesuré la ou les concentrations microbiennes auxquelles les oiseaux ont été exposés dans seulement 7 % des essais, et quelques essais (7 % également) comportaient la mesure de l'infectivité.

#### 14.1.2 Méthode d'essai biologique recommandée

L'essai biologique normalisé que l'on recommande d'utiliser pour mesurer les effets écologiques potentiels d'une nouvelle substance microbienne sur des oiseaux consiste en un essai de pathogénicité et/ou de toxicité pour des groupes de canards colverts (*A. platyrhynchos*) ou de colins de Virginie (*C. virginianus*) âgés de 14–28 jours. Cette recommandation est conforme aux lignes directrices de l'USEPA (1996k,l) applicables aux essais de 30 jours visant à déterminer les effets pathogènes et/ou toxiques d'AAM ou de leur PC sur ces espèces et d'autres espèces aviennes dans des conditions de laboratoire contrôlées. Selon EC et SC (2001), le canard colvert fait partie des espèces aviennes à envisager pour la mesure des effets d'une nouvelle substance microbienne sur des vertébrés terrestres. Pour sa part, l'ARLA (2001) recommande d'utiliser le canard colvert ou le colin de Virginie pour évaluer les effets d'AAM sur des oiseaux. On préconise d'employer ces espèces du fait que leur sensibilité aux pathogènes microbiens et aux substances toxiques est établie, sans compter que les essais de 30 jours visant à mesurer les effets nocifs de nouvelles substances microbiennes sur des canards colverts ou des colins de Virginie sont acceptés par les organismes de réglementation et appliqués par les laboratoires d'essai (v. § 14.1.1). On trouvera à la sous-section 8.7 les éléments qui guideront le choix de l'une ou l'autre de ces espèces d'oiseaux plutôt que d'une espèce de petit mammifère (ou en plus d'un petit mammifère) pour satisfaire aux exigences en matière d'essais de pathogénicité et/ou de toxicité pour des vertébrés terrestres.

<sup>81</sup> On peut remplacer l'exposition pulmonaire par une injection (intraveineuse ou péritonéale), pourvu que la matière d'essai renferme peu de protéines exogènes ou d'autres contaminants susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai. Cette voie d'exposition est peu réaliste dans l'environnement, mais elle constitue un cas de danger maximal du fait qu'elle court-circuite les mécanismes primaires de défense de l'oiseau (ARLA, 2001).



Le tableau 13 résume les procédures et conditions applicables à un essai de 30 jours sur de jeunes canards colverts ou colins de Virginie. Le plan de base de l'étude est conforme aux lignes directrices de l'USEPA relatives aux essais de 30 jours au cours desquels des oiseaux sont exposés à la matière d'essai par voie orale (c.-à-d. par gavage; v. § 3.4.5) (USEPA, 1996k) ou par les voies respiratoires (c.-à-d. par inhalation; v. § 3.4.6) (USEPA, 1996l). Dans les spécifications mentionnées ici pour ce qui est du nombre acceptable d'oiseaux par cage et des conditions d'éclairage, de température et d'humidité qui conviennent, on a tenu compte des lignes directrices provisoires de l'USEPA (1996mm) applicables aux essais de toxicité par voie orale menés sur de jeunes canards colverts ou colins de Virginie.

Avant la mise en route de l'essai, des groupes de 10 jeunes (p. ex., âgés de 7–21 jours) canards colverts ou colins de Virginie sont maintenus dans des cages identiques pendant au moins 7 jours, dans des conditions en tout point semblables (ce qui inclut le régime alimentaire) à celles qui seront appliquées pendant l'essai définitif. Au début des essais, l'âge (14–28 jours) et la masse des oiseaux doivent être le plus uniformes possible. L'exposition des oiseaux à une concentration de la matière d'essai (c.-à-d. la DDM) ou à plusieurs (essai à concentrations multiples) prend la forme d'une administration quotidienne d'une quantité mesurée de la nouvelle substance microbienne pendant les 5 premiers jours de l'essai. On doit déterminer la masse corporelle des oiseaux vivants de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement au début de l'essai afin d'établir la dose propre à chaque traitement (v. § 3.3.1, 3.3.2, 3.4.5 et 3.4.6). Par la suite, les oiseaux sont pesés chaque semaine jusqu'au terme de l'essai. Une fois terminée la période d'exposition à la matière d'essai, on continue d'observer quotidiennement le comportement et l'aspect (y compris les lésions externes) des oiseaux vivants de chaque cage, jusqu'au jour 30 (USEPA, 1996k,l). Tout au long de la période d'acclimatation et de l'essai, on doit fournir aux oiseaux de chaque cage une ration excédentaire (à volonté) des mêmes aliments<sup>82</sup>. Il faut

pratiquer des autopsies de chaque oiseau qui meurt pendant l'essai, de même que de ceux qui ont survécu. Un examen soigneux de chaque oiseau permettra de détecter toute anomalie ou lésion externe ou interne. Il faudrait disséquer les organes ou tissus qui semblent atypiques, les préserver et les examiner ultérieurement pour détecter les histopathologies.

Chaque essai doit comporter un témoin négatif, et il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux. Le recours à un témoin sur filtrat stérile est également facultatif (v. section 4), mais recommandé. La mesure de l'infectivité à partir d'un ou de plusieurs organes, tissus ou liquides organiques (p. ex., sang ou urine) choisis des oiseaux exposés à chaque traitement doit être effectuée au terme de l'essai si les techniques d'analyse le permettent (v. section 5). Il n'est pas obligatoire de procéder à d'autres mesures de l'infectivité et de la clairance au cours de l'essai (p. ex., toutes les semaines), mais de telles mesures seraient utiles pour surveiller le début et la progression de toute infectivité pendant l'essai. Les spécifications propres aux essais à concentration unique (§ 3.3.1) ou à concentrations multiples (§ 3.3.2) sont résumées au tableau 13. Il convient de se conformer aux indications fournies aux sous-sections 3.3.1, 3.3.2, 3.4.5 et 3.4.6 lors du mélange de la matière d'essai et de son administration par voie orale ou par inhalation. Si possible, on devrait quantifier la dose quotidienne de la nouvelle substance microbienne administrée aux oiseaux de chaque traitement au cours des 5 premiers jours de l'essai (v. § 3.5).

Dans un essai à concentration unique, la DDM de la matière d'essai est administrée selon un seul mode d'exposition [c.-à-d. par voie orale (gavage) ou par inhalation]. Si l'on procède à un essai à concentrations multiples, on devrait mesurer séparément les effets de chacun de ces modes d'exposition (v. § 3.2). La décision quant au mode à privilégier dépend de la façon dont la nouvelle substance microbienne sera appliquée dans l'environnement (p. ex., sous forme de pulvérisation aérienne ou de solide répandu sur l'eau ou le sol) et de la voie ou des voies par lesquelles la substance viendra vraisemblablement en contact avec les oiseaux. Dans chaque essai à concentrations

<sup>82</sup> Les besoins alimentaires varient selon l'espèce et l'âge des oiseaux d'expérimentation. Tout aliment non médicamenteux du commerce qui répond aux normes minimales d'alimentation de l'espèce est acceptable (ASTM, 2000p). Les mêmes aliments non contaminés que l'on trouve sur le marché et qui conviennent aux oiseaux

(pâtée de début ou pâtée plus grossière) devraient être donnés aux oiseaux de chaque traitement; la ration dépend de la taille moyenne des oiseaux (tous les traitements) et des recommandations du fabricant.

**Tableau 13 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de 30 jours sur le canard colvert (*Anas platyrhynchos*) ou le colin de Virginie (*Colinus virginianus*)**

**Essai universel**

Méthode d'essai	— Conforme à USEPA (1996k), <i>Microbial Pesticide Test Guidelines — Avian Oral, Tier I</i> , et à USEPA (1996l), <i>Microbial Pesticide Test Guidelines — Avian Inhalation Test, Tier I</i> .
Type d'essai	— Essai visant à mesurer les effets nocifs sur la survie, le comportement et l'aspect (y compris lors de l'examen macroscopique et, au besoin, microscopique des tissus et organes) des oiseaux exposés par voie orale et/ou par inhalation (c.-à-d. par instillation nasale ou trachéale).
Régime d'administration des doses	— Administration quotidienne, les 5 premiers jours de l'essai seulement.
Durée de l'essai	— 30 jours.
Organismes d'essai	— Jeunes oiseaux âgés de 14–28 jours au début de l'essai, acclimatés auparavant aux enceintes expérimentales et aux conditions de l'essai pendant $\geq 7$ jours.
Enceinte expérimentale	— Cages (p. ex., enclos d'élevage du commerce) dont le fond a une superficie de $\geq 800$ cm <sup>2</sup> /oiseau (canards) ou de $\geq 600$ cm <sup>2</sup> /oiseau (colins).
Nombre d'oiseaux par enceinte expérimentale	— 10
Température	— Moyenne quotidienne de $25 \pm 5$ °C.
Humidité relative	— 45–70 %.
Éclairage	— Incandescent ou fluorescent; intensité lumineuse de 500–1000 lux; photopériode : $14 \pm 1$ h de clarté et $10 \pm 1$ h d'obscurité; transition graduelle entre clarté et obscurité et vice versa.
Alimentation	— À volonté, sous forme d'aliments pour oiseaux du commerce, de la consistance appropriée (p. ex., pâtée de début).
Témoins	— Chaque essai doit inclure un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
Mode d'exposition	— Par voie orale (gavage) ou par inhalation, que l'essai soit à concentration unique ou à concentrations multiples.
DDM administrée par voie orale	— Concentration prévue de micro-organismes (unités/mL) dans la matière d'essai ou sa suspension aqueuse $\times 5$ mL/kg de masse corporelle $\times$ masse de l'oiseau (kg) (v. § 3.3.1.8).
DDM administrée par inhalation	— Concentration prévue de micro-organismes (unités/mL) dans la matière d'essai ou sa suspension aqueuse $\times 0,2$ mL/kg de masse corporelle $\times$ masse de l'oiseau (kg) (v. § 3.3.1.9).
Essai d'infectivité	— Exigé à la fin de l'essai si les techniques d'analyse le permettent; fondé sur les concentrations mesurées de la nouvelle substance microbienne dans des organes (p. ex., cœur, cerveau, reins, foie), tissus ou liquides organiques (p. ex., sang ou urine) choisis d'oiseaux de chaque traitement, à la fin de l'essai; essai d'infectivité facultatif pendant l'essai.
Mesures	— Mesure de la température dans l'installation d'essai, maximum et minimum quotidiens ou en continu; humidité relative de l'installation au moins une fois par semaine; masse corporelle de chaque oiseau de chaque cage et de chaque traitement au début de l'essai, puis hebdomadairement par la suite; quotidiennement pendant les 5 premiers jours, si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne dans la suspension aqueuse utilisée pour chaque traitement (y compris les témoins).

- Observations — Observations quotidiennes de la survie, de tout comportement anormal (p. ex., léthargie, agressivité excessive) et de l'aspect (y compris les lésions externes) des oiseaux de chaque cage; autopsie de chaque oiseau mort pendant l'essai, de même que des oiseaux qui ont survécu jusqu'à la fin de l'essai; détection de lésions apparentes; prélèvement de tissus en vue de leur traitement et de leur examen ultérieur au microscope, au besoin.
- Paramètres biologiques — Survie, aspect (y compris au moment de l'autopsie pratiquée à la fin de l'essai) et comportement des spécimens de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au cours et au terme de l'essai.
- Validité de l'essai — Essai invalide si la survie est de <90 % dans le groupe témoin négatif à la fin de l'essai.

### ***Essai à concentration unique***

- Nombre de traitements — Au moins deux (DDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
- Nombre de répétitions — Trois par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
- Nombre d'oiseaux par traitement — 30
- Mode d'exposition — Par voie orale (gavage) ou par inhalation (un mode d'exposition par essai).
- Paramètres statistiques — Pour chaque enceinte expérimentale et chaque traitement : pourcentage de survie à la fin de l'essai; pourcentage d'oiseaux ayant survécu et dont l'aspect (d'après les autopsies) et/ou le comportement sont atypiques, à la fin de l'essai.
- Comparaisons statistiques — DDM et témoin négatif à la fin de l'essai, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie et dans le pourcentage d'oiseaux ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique le jour 30; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

- Nombre de concentrations (ou nombre de traitements) — Au moins cinq, dont la DDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
- Nombre de répétitions — Une par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
- Nombre d'oiseaux par traitement — 10
- Mode d'exposition — Par voie orale (gavage) ou par inhalation (un mode d'exposition par essai).
- Paramètres statistiques — Pour chaque enceinte expérimentale et chaque traitement : pourcentage de survie à la fin de l'essai; pourcentage d'oiseaux ayant survécu et dont l'aspect (d'après les autopsies) et/ou le comportement sont atypiques, à la fin de l'essai; si les données le permettent,  $DL_{50}$  30 jours et  $DE_{50}$  30 jours en regard de l'aspect et/ou du comportement atypiques, DSEO/DMEO.
- Comparaisons statistiques — Concentrations expérimentales et témoin négatif à la fin de l'essai, pour détecter tout écart significatif dans le pourcentage de survie et dans le pourcentage d'oiseaux ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique le jour 30; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.
-

multiples, il faut utiliser la matière d'essai à sa DDM et à des concentrations plus faibles pour chaque mode d'exposition; on doit aussi prévoir un témoin négatif et, selon le plan de l'étude, un ou plus d'un autre témoin (v. section 4). La présente méthode d'essai biologique exige au moins cinq concentrations expérimentales ainsi qu'un témoin ou plus dans le cas d'un essai à concentrations multiples.

Les paramètres biologiques sont fondés sur la survie jusqu'au jour 30, de même que sur le comportement et sur l'aspect (y compris au moment de l'autopsie et à l'issue des examens histopathologiques ultérieurs) du ou des groupes d'oiseaux de chaque traitement. Le tableau 13 résume le type d'observations à effectuer chaque jour, tout au long de l'essai, quant au comportement et à l'aspect des oiseaux de chaque traitement (dont ceux du témoin négatif et des autres témoins). Au cours de ces observations, tout oiseau mort doit être enlevé de la cage, et il faut procéder à un examen macroscopique détaillé de ses tissus et organes externes et internes (après dissection dans ce dernier cas) (p. ex., plumage, épithélium, yeux, bec, pieds, cavité buccale, œsophage, estomac, jabot, intestins, trachée, poumons, cerveau, foie, vésicule biliaire, cœur, rate et reins). Le jour 30, chacun des oiseaux encore vivants de chaque traitement (et du traitement témoin négatif) doit être mis à mort et soumis au même type d'examen macroscopique. Si l'autopsie révèle des lésions ou des anomalies, on devrait prélever des échantillons et les conserver dans le formaldéhyde (ou un autre agent de conservation adéquat) en vue d'examens histopathologiques ultérieurs, le cas échéant. Au cours des préparatifs et de la conduite des examens post-mortem, il est recommandé de consulter le guide de Butcher et Miles (1996) ([http://edis.ifas.ufl.edu/BODY\\_VM009](http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_VM009)), qui traite d'une manière concise des autopsies pratiquées sur les oiseaux. Les tissus choisis pour les examens histopathologiques sont fonction de la nature de la matière d'essai à l'étude et des informations déjà recueillies sur ses effets pathogènes et/ou toxiques (v. § 3.1). On recommande d'utiliser des spécimens représentatifs d'organes comme le foie, les reins, le cerveau, les poumons, le tractus gastro-intestinal et l'appareil reproducteur. Même en l'absence de lésions visibles au cours de l'autopsie, on devrait prélever certains tissus (dont le cerveau) aux fins d'un éventuel examen histopathologique si des signes cliniques de maladie (p. ex., faible gain de poids ou signes neurologiques) ont été observés.

Dans certaines circonstances, si l'autopsie ou des signes cliniques pointent vers des effets nocifs possibles sur le système *hématopoïétique*, il pourrait être utile de prélever un échantillon de sang lors de l'autopsie et de soumettre cet échantillon à une analyse de variables, comme la leucocytémie différentielle, le volume des cellules concentrées et les protéines plasmatiques, afin de déterminer les effets sur le système immunitaire. Le prélèvement de <1 mL de sang dans un tube à microhématocrite est suffisant pour les deux dernières analyses (Feldman et coll., 2000); on emploiera une gouttelette de sang étalée sur une lame de verre pour la leucocytémie différentielle (c.-à-d. pourcentages de lymphocytes de petite taille, de lymphocytes de grande taille, de neutrophiles, de polynucléaires œsinophiles, de monocytes et de macrophages).

Dans le cas d'un essai à concentration unique, les paramètres statistiques à mesurer au terme de l'essai de 30 jours incluent les suivants, pour chaque enceinte expérimentale et pour chaque traitement :

- 1) pourcentage de survie des oiseaux;
- 2) pourcentage d'oiseaux affichant un comportement atypique (p. ex., agressivité accrue, léthargie, picorage des doigts);
- 3) pourcentage d'oiseaux dont un ou plusieurs organes ou tissus sont d'apparence anormale (p. ex., lésions externes ou internes, œil opaque ou présentant des signes d'hémorragie, foie décoloré ou plus volumineux).

Une fois établies pour la DDM et pour tout traitement témoin, les valeurs respectives de ces paramètres devraient être comparées à celles établies pour le témoin négatif, à l'aide d'un test statistique permettant des comparaisons par paire, comme la *test de Student*. Il convient de consulter les méthodes statistiques que renferme le guide des essais d'écotoxicité d'Environnement Canada (2004d) pour déterminer les paramètres à mesurer ainsi que pour choisir les méthodes à appliquer.

Les paramètres statistiques décrits ci-dessus s'appliquent également aux essais à concentrations multiples. Si les données le permettent (v. § 3.3.2), la DL<sub>50</sub> 30 jours de la matière d'essai devrait être établie, de même que la pente de sa courbe et ses limites de confiance de 95 %. Dans la mesure du

possible, on devrait aussi calculer la  $DE_{50}$  30 jours d'après l'aspect et/ou le comportement atypiques de chaque oiseau de chaque traitement, ainsi que la pente de sa courbe et ses limites de confiance de 95 %. Toujours si les données le permettent, il faudrait calculer et déclarer la DSEO et la DME0 en regard de la survie après 30 jours, de même que les valeurs à attribuer à l'aspect et/ou au comportement atypiques des oiseaux. EC (2004d) renferme des conseils sur les logiciels (et leur application) à utiliser pour déterminer la  $DL_{50}$  ou la  $DE_{50}$  ou pour calculer la DME0 et la DSEO. En outre, on devrait consulter ce document lors du choix des méthodes statistiques applicables aux données tirées de l'étude sur l'aspect (y compris celui observé lors des autopsies) et le comportement des oiseaux.

#### 14.1.3 *Autres méthodes ou procédures*

Kerwin (1992) a passé en revue les méthodes et procédures applicables, à l'époque, aux essais visant à mesurer les effets de produits chimiques et de micro-organismes sur des oiseaux dans des conditions de laboratoire contrôlées. Son rapport renferme de l'information utile sur les perspectives historiques des essais sur la sécurité microbienne pour les espèces aviennes, de même que des directives valables sur le choix des espèces à utiliser, les modes d'exposition et les éléments statistiques à considérer.

En plus de ses lignes directrices relatives aux essais de 30 jours sur les effets pathogènes et/ou toxiques de pesticides microbiens sur des oiseaux (USEPA, 1996k,l), l'USEPA a établi des lignes directrices applicables à un essai de toxicité chronique au cours duquel on détermine les effets d'AAM sur la survie à long terme d'oiseaux adultes (canards colverts ou colins de Virginie, de préférence), sur le succès de reproduction de ces oiseaux, de même que sur la survie et la croissance de leurs descendants (USEPA, 1996m). On devrait envisager de mener cet essai (v. § 14.1.1) en employant le canard colvert ou le colin de Virginie si l'on a besoin de renseignements faisant autorité sur les effets chroniques d'une exposition prolongée d'oiseaux à de faibles concentrations d'une nouvelle substance microbienne dans le régime alimentaire. On trouvera dans USEPA (1996ll) des spécifications supplémentaires applicables à cet essai. S'il est décidé de procéder à cet essai, il convient d'intégrer dans le plan d'expérience et d'appliquer la plupart des procédures et conditions résumées au tableau 13 (p. ex., essai d'infectivité, mesures, observations,

paramètres biologiques et statistiques, comparaisons statistiques). Si l'on procède à un essai à concentrations multiples, d'autres statistiques pourraient être établies au moyen de paramètres quantitatifs ( $DI_p$ ) concernant la reproduction, à la condition de disposer de suffisamment de données.

Certains micro-organismes sont des *cancérogènes* connus (ou contribuent à la *cancérogénicité*). On pourrait prolonger la période d'observation (p. ex., pendant un an ou plus) d'animaux choisis au hasard parmi les organismes d'essai et les organismes des groupes témoins si l'on considère que la nouvelle substance microbienne à l'étude a un potentiel cancérogène. Ces animaux seraient ensuite mis à mort et soumis à une autopsie détaillée. Toute anomalie apparente des organes pourrait alors être examinée soigneusement, et tout tissu suspect pourrait être prélevé en vue d'un examen au microscope. Dans le cas des substances présumées nocives pour l'appareil reproducteur, des animaux adultes choisis au hasard (organismes d'essai et témoins) pourraient être accouplés en vue de l'évaluation des taux de fertilité et de conception. Dès la naissance, les descendants de ces animaux seraient soumis à des autopsies comportant l'examen de toute anomalie.

Outre les lignes directrices provisoires de l'USEPA applicables aux essais de reproduction des oiseaux (USEPA, 1996ll), deux autres documents de la série 850 (essais sur les effets écologiques) portent sur la mesure des effets de matières d'essai sur des oiseaux (USEPA, 1996kk,mm). Le premier (USEPA, 1996kk) décrit un essai de toxicité au cours duquel des canards colverts ou des colins de Virginie âgés de 5–10 jours sont exposés pendant 5 jours à la matière d'essai mélangée aux aliments, puis observés pendant 3 jours, le plus souvent. L'ASTM (2000p) a mis au point, pour ces espèces et d'autres espèces d'oiseaux, une méthode d'essai semblable (soit une exposition à une ou plusieurs concentrations de la matière d'essai mélangée aux aliments et une période d'observation de  $\geq 3$  jours). Le deuxième document de l'USEPA (1996mm) décrit un essai de toxicité aiguë comportant l'administration par voie orale (gavage) d'une seule dose de la matière d'essai à de jeunes oiseaux adultes de l'une ou l'autre de ces espèces, suivie d'une période d'observation de  $\geq 14$  jours. Aucune de ces méthodes d'essai n'est considérée comme un substitut acceptable à l'essai de 30 jours recommandé à la sous-section 14.1.2 du fait de la brièveté des essais et, dans le cas de USEPA

(1996mm), de l'administration d'une seule dose par voie orale.

## 14.2 Petits mammifères

### Repères

- *L'essai biologique normalisé que l'on recommande d'utiliser pour mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes sur de petits mammifères consiste en un essai de  $\geq 21$  jours sur la survie, l'aspect et le comportement de jeunes rats ou souris adultes.*
- *L'essai est mené conformément à USEPA (1996o) si la nouvelle substance microbienne est administrée par voie orale (gavage) ou à USEPA (1996p) si elle est administrée par inhalation.*
- *Cette méthode d'essai biologique prévoit l'autopsie des rongeurs à la fin de l'essai en vue de détecter les changements macroscopiques dans les tissus ou les organes et, au besoin, les effets histologiques. L'infectivité doit être mesurée à la fin des essais si les méthodes d'analyse le permettent.*
- *Il existe des directives sur l'exécution d'essais visant à mesurer les effets subchroniques (90 jours) ou chroniques (1 an) de nouvelles substances microbiennes sur les rongeurs (USEPA, 1996t,u); ces directives pourraient être appliquées, au besoin, si l'on se préoccupe des effets différés ou à long terme d'une nouvelle substance microbienne donnée.*
- *L'essai de  $\geq 21$  jours sur des rats ou des souris pourrait également être appliqué, après acclimatation aux conditions de laboratoire, à des petits mammifères sauvages prélevés sur le terrain. Dans la plupart des cas, toutefois, un essai de  $\geq 21$  jours sur des rongeurs domestiques (c.-à-d. des rats ou des souris élevés en laboratoire) conviendra à l'étude des effets nocifs potentiels de nouvelles substances microbiennes sur de petits mammifères.*

### 14.2.1 Essais antérieurs avec des micro-organismes ou des produits microbiens

L'étude documentaire de Douville (2001) sur les méthodes et procédures d'essai ayant trait à l'évaluation de la pathogénicité et de la toxicité de micro-organismes pour les plantes ou animaux aquatiques et terrestres fait état d'études antérieures sur des animaux sauvages, de même que des méthodes existantes applicables aux essais sur ces animaux. Douville a relevé deux études comportant

l'exposition d'animaux sauvages (vison, polatouche, grande musaraigne, souris à pattes blanches, opossum, raton laveur) à des pathogènes viraux ou fongiques dans des conditions de laboratoire contrôlées. Les résultats des essais sur des mammifères domestiques (p. ex., souris, rats et lapins) exposés en laboratoire à de nouvelles substances microbiennes ne sont pas mentionnés (Douville 2001).

L'USEPA (1996b) indique, dans son document d'information décrivant les lignes directrices applicables aux essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'AAM sur diverses espèces non visées d'organismes d'essai, que ses lignes directrices de la série 885 portant sur l'évaluation des risques d'AAM pour les humains (c.-à-d. USEPA, 1996n-u), où de petits mammifères domestiques sont utilisés comme organismes d'essai (hôtes), conviennent normalement à l'évaluation des risques pour les animaux sauvages. Il existe toutefois une exception : lorsque diverses espèces de mammifères manifestent des sensibilités très différentes à un AAM ou que des indices portent à croire que des mammifères sauvages seront fortement exposés à un AAM, il pourrait être nécessaire de procéder à des essais sur des mammifères sauvages, conformément à USEPA (1996v). Pour ces essais, les mammifères sauvages doivent être exposés à l'AAM par gavage (dose orale à action immédiate) ou par inhalation (instillation nasale). La procédure d'administration de l'AAM devrait refléter le mode d'exposition le plus probable dans le milieu naturel (USEPA, 1996v).

Les essais suivants sont décrits dans les lignes directrices de la série 885 de l'USEPA applicables aux essais sur de petits mammifères domestiques utilisés comme organismes hôtes :

- essai de  $\geq 21$  jours sur de jeunes rats ou souris adultes, comportant l'administration d'une seule dose élevée d'un AAM par voie orale (gavage), puis les observations suivantes : mortalité, masse corporelle (chaque semaine), comportement atypique, infectivité et clairance de l'AAM, pathologies apparentes et microscopiques à la fin de l'essai (USEPA, 1996o);
- essai de  $\geq 21$  jours sur de jeunes rats ou souris adultes, comportant l'administration d'une seule dose élevée d'un AAM par inhalation (c.-à-d. instillation nasale ou trachéale), puis les

observations suivantes : mortalité, masse corporelle (chaque semaine), comportement atypique, infectivité et clairance de l'AAM, pathologies apparentes et microscopiques à la fin de l'essai (USEPA, 1996p);

- essai de  $\geq 21$  jours sur de jeunes rats ou souris adultes, comportant l'administration d'une seule dose élevée d'un AAM par injection intraveineuse ou intrapéritonéale, puis les observations suivantes : mortalité, masse corporelle (chaque semaine), comportement atypique, infectivité et clairance de l'AAM, pathologies apparentes et microscopiques à la fin de l'essai (USEPA, 1996q);
- essai de  $\geq 14$  jours sur de jeunes lapins albinos adultes, comportant l'administration topique d'une seule dose élevée d'un AAM, puis les observations suivantes après 24 h : mortalité, irritation cutanée, masse corporelle (chaque semaine), comportement atypique, autopsie à l'œil nu à la fin de l'essai si des effets toxiques sont évidents (USEPA, 1996r);
- essai de  $\geq 14$  jours sur de jeunes rats, souris ou (dans le cas d'un essai visant des effets cutanés) lapins, comportant une seule exposition à des concentrations multiples d'un AAM administrées par voie orale, pulmonaire ou cutanée, puis les observations suivantes : effets post-exposition sur le comportement et l'aspect des animaux pendant l'essai et au terme de celui-ci (USEPA, 1996s);
- essai de  $\geq 90$  jours sur de jeunes rats ou souris adultes, comportant l'administration quotidienne d'une seule dose élevée d'un AAM par voie orale ou par inhalation, puis les observations quotidiennes suivantes : indices de pathogénicité et/ou de toxicité, mortalité, masse corporelle (chaque semaine), comportement atypique, infectivité, pathologies apparentes à la fin de l'essai (USEPA, 1996t);
- essai à long terme sur de jeunes rats ou souris (6-8 semaines), comportant l'administration quotidienne d'une seule dose élevée d'un AAM par voie orale et servant à mesurer les effets de cet AAM sur la fertilité/reproduction et sur le développement fœtal de leurs descendants jusqu'à la naissance; observations : mortalité, comportement atypique, anomalies cliniques et

infectivité (tous les jours), pathologies (à la fin de l'essai) (USEPA, 1996u).

Les essais de  $\geq 21$  jours comportant une exposition à un AAM par voie orale, par voie pulmonaire ou par injection (USEPA, 1996m,n,o) sont conçus pour permettre une évaluation de la pathogénicité, de l'infectivité et de la toxicité d'une matière d'essai. Selon l'USEPA (1996n), les données tirées de ces trois essais fourniront « une évaluation relativement complète des risques potentiels dans la plupart des cas ». L'essai de toxicité cutanée aiguë mené conformément à USEPA (1996r) convient surtout à l'évaluation de la toxicité d'un AAM (USEPA, 1996n), tandis que l'essai de 14 jours à concentrations multiples décrit dans USEPA (1996s) permet avant tout de déterminer la dose létale médiane. Par ailleurs, l'essai de  $\geq 90$  jours détaillé dans USEPA (1996t) vise à recueillir de l'information sur les risques sanitaires associés à une exposition subchronique. Enfin, l'essai à long terme visant à mesurer les effets sur la reproduction et sur le développement des fœtus est conçu, selon l'USEPA (1996u), pour établir le risque estimatif que représente, pour les humains, un AAM (virus ou parasite des cellules mammaliennes) dont on observe l'infectivité en l'absence d'indices de toxicité ou de pathogénicité dans un essai de toxicité subchronique mené conformément à USEPA (1996t).

À l'instar de l'USEPA (1996b), l'ARLA (Santé Canada) indique dans sa directive d'homologation des AAM et de leurs produits que les données *toxicologiques* exigées pour l'estimation des dangers sur le plan tant de la santé humaine que de la sécurité « suffisent ordinairement pour estimer le danger chez les mammifères sauvages » (ARLA, 2001, partie 9.3, intitulée « Mammifères sauvages »). Elle précise aussi que les essais de laboratoire sur des petits mammifères exposés à un AAM ou à une PC devraient être menés conformément à la partie 4, intitulée « Études de la santé humaine et de la sécurité ». Pour les essais de pathogénicité et/ou de toxicité et les essais d'infectivité, une seule dose élevée de la matière d'essai est administrée par voie orale (gavage) ou par instillation nasale ou trachéale à chaque animal; les observations effectuées pendant au moins 21 jours sont suivies d'une autopsie à l'œil nu et, au besoin, au microscope. On trouve aussi dans ARLA (2001) des indications sur les essais d'infectivité d'AAM ou de PC sur de petits mammifères domestiques. Des essais additionnels sur

des mammifères sauvages peuvent être exigés s'il est prévu que certaines espèces seront fortement exposées à l'AAM dans des conditions normales d'emploi. Dans un tel cas, il faut choisir des espèces qui sont représentatives de celles de l'écozone ou des écozones où le produit doit être utilisé et qui risquent d'être le plus vulnérables, compte tenu du profil d'emploi de l'AAM (ARLA, 2001).

Dans sa réponse au questionnaire non officiel de 2002 (v. § 8.8), la division des pesticides microbiens de l'USEPA indique qu'elle dispose de données sur ~91 essais de laboratoire au cours desquels les effets d'AAM ou de leur PC ont été mesurés sur des rongeurs (rats ou souris). Dans tous les cas, il s'agissait d'essais de 21–90 jours à concentration unique (DDM), menés conformément aux lignes directrices de la série 885, soit USEPA (1996o,p,t). Peu de ces essais (<4 %) ont mis en lumière des effets pathogènes et/ou toxiques démontrables. Aucun des essais ne comportait de témoin sur filtrat stérile, de témoin microbien positif ou de témoin chimique positif, tandis que ~50 % des essais incluaient un témoin non infectieux; tous prévoyaient la mesure de l'infectivité. Les concentrations microbiennes auxquelles les rongeurs étaient exposés n'ont pas été établies.

#### 14.2.2 Méthode d'essai biologique recommandée

Il est recommandé de mener un essai de pathogénicité et/ou toxicité, d'une durée de  $\geq 21$  jours, sur de jeunes rats ou souris adultes pour mesurer les effets écologiques potentiels de nouvelles substances microbiennes sur de petits mammifères. Les procédures et conditions applicables sont pratiquement les mêmes que celles décrites au tableau 13 pour les essais sur les oiseaux, sauf que les essais durent moins longtemps et que la dose est administrée en une seule fois (au début de l'essai) plutôt que quotidiennement pendant les 5 premiers jours de l'expérience. La méthode décrite ici est conforme aux lignes directrices de la série 885 de l'USEPA portant sur la détermination de la toxicité aiguë ( $\geq 21$  jours) et/ou de la pathogénicité d'un AAM administré par voie orale (USEPA, 1996o) ou par inhalation (USEPA 1996p) à de jeunes rats ou souris adultes. Certaines des conditions définies dans ASTM (2000q,r) pour les essais de toxicité sur des rats<sup>83</sup> ont

<sup>83</sup> Ces conditions incluent une plage acceptable de température et d'humidité relative dans les installations d'essai (ASTM, 2000q,r), la photopériode convenant aux

été prises en compte et adaptées, au besoin, lors de la mise au point de la présente méthode. On trouvera dans ces lignes directrices et méthodes d'essai biologique les spécifications propres aux essais qui ne sont pas mentionnées ici.

Le plan d'expérience de la méthode d'essai biologique recommandée pour les rats ou les souris (v. tableau 14), y compris le mode d'administration de la matière d'essai, est conforme, dans l'ensemble, à ARLA (2001) pour ce qui est de la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques d'AAM ou de leur PC sur de petits mammifères domestiques. On trouvera à la sous-section 8.7 certains des motifs justifiant le choix d'un rongeur (c.-à-d. rat ou souris) pour les essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne. Cette sous-section renferme aussi des indications sur les éléments qui guideront le choix d'un petit mammifère plutôt que d'une espèce avienne (§ 14.1) pour évaluer les effets écologiques potentiellement néfastes d'une nouvelle substance microbienne donnée sur des vertébrés terrestres.

On devrait avoir recours, pour les essais, à des souches de souris ou de rats utilisées couramment dans les laboratoires. On recommande d'utiliser des souris CD-1 ou B6C3F-1 et des rats Sprague-Dawley ou Wistar. Il faudrait choisir de jeunes adultes mâles et femelles en nombre égal pour chaque traitement (USEPA, 1996o,p). Pour un essai donné, tous les animaux doivent provenir d'une seule source, être issus de la même souche et être d'un âge et d'une taille similaires (ASTM, 2000q). Au début de l'essai, la masse des animaux ne devrait pas s'écarter de plus de 20 % de la masse moyenne des animaux de même sexe (USEPA, 1996o,p; ASTM, 2000q). Les femelles devraient être *nullipares* et non gestantes. Avant de procéder à l'expérimentation, on devrait acclimater les animaux aux conditions de l'essai pendant au moins 7 jours<sup>84</sup>. Il est recommandé d'isoler chaque animal dans une cage identique à celle qui sera utilisée au cours de l'essai<sup>85</sup>. De telles dispositions sont courantes

---

essais (ASTM, 2000q) et la superficie minimale du fond des cages (ASTM, 2000q).

<sup>84</sup> Selon l'ASTM (2000q), l'acclimatation des rongeurs aux aliments et à l'eau, de même qu'à la température, à l'humidité et à l'éclairage des installations d'essai, devrait durer 14 jours.

<sup>85</sup> Le fait d'isoler chaque animal pendant l'acclimatation et l'essai permettra de prévenir les interactions de nature agressive (USEPA, 1996o,p; ASTM, 2000q,r).



dans le cas des souris et des rats utilisés pour les études de toxicité aiguë. Les souris étant naturellement grégaires, il est recommandé de grouper quelques femelles adultes par cage pour les études de toxicité chronique. Étant donné qu'après la puberté, les souris mâles sont susceptibles d'engager des combats, il est difficile de les loger ensemble. Dans le cas des rats, il est peu probable que les mâles et les femelles fassent preuve d'agressivité lorsqu'ils sont logés avec des congénères du même sexe; cependant, on a coutume de placer un rat par cage. Toutes les cages utilisées pour les essais doivent être identiques. La superficie du fond des cages devrait être de  $\geq 250$  cm<sup>2</sup> pour les rats logés seuls, de  $\geq 100$  cm<sup>2</sup> pour les souris logées seules et de 160 cm<sup>2</sup> pour les souris logées en groupes. Dans ce dernier cas, on ne placera pas plus de quatre ou cinq souris par cage. Les souris et les rats peuvent être identifiés au moyen d'un tatouage ou d'un implant sous-cutané de puce électronique. On peut aussi pratiquer une entaille à l'oreille dans le cas des souris (CCPA, 1993).

Lors de la mise en route des essais, il faut choisir des animaux de taille semblable, peser chacun et déterminer son sexe. On doit prévoir, pour chaque traitement (dont le témoin négatif), au moins cinq femelles et cinq mâles que l'on transfère dans des cages individuelles. L'exposition des rongeurs à une concentration de la matière d'essai (c.-à-d. la DDM) ou à plusieurs (essai à concentrations multiples) prend la forme d'une seule dose administrée par gavage (v. § 3.4.5) ou par inhalation (v. § 3.4.6) au début de l'essai. On doit déterminer la masse corporelle des animaux vivants de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement au début de l'essai (jour 0) afin d'établir, pour chaque traitement, la ou les doses (v. § 3.3.1, 3.3.2, 3.4.5 et 3.4.6) administrées le jour 0. Par la suite, les animaux sont pesés chaque semaine jusqu'au terme de l'essai. On observe jusqu'à la fin de l'essai le comportement et l'aspect des rongeurs toujours vivants de chaque cage (USEPA, 1996k,l). Tout au long de la période d'acclimatation et de l'essai, on doit fournir aux animaux de chaque cage une ration excédentaire des mêmes aliments pour rongeurs<sup>86</sup>. À la fin de l'essai, il faut procéder à une autopsie détaillée de chaque rongeur qui meurt pendant l'essai, de même que des

rongeurs qui ont survécu. On doit examiner soigneusement et méthodiquement tout signe externe et interne de pathologie apparente. Il faudrait disséquer les organes ou tissus qui semblent atypiques, les préserver et les conserver à part en vue d'un examen microscopique ultérieur, le cas échéant. Même en l'absence de lésions visibles au cours de l'autopsie, on devrait prélever certains tissus (dont le cerveau) aux fins d'un éventuel examen histopathologique si des signes cliniques de maladie (p. ex., faible gain de poids ou signes neurologiques) ont été observés.

Dans certaines circonstances, si l'autopsie ou des signes cliniques pointent vers des effets nocifs possibles sur le système hématopoïétique, il pourrait être utile, lors de l'autopsie, de prélever un échantillon de sang que l'on soumettra à une analyse de variables, comme la leucocytémie différentielle, le volume des cellules concentrées et les protéines plasmatiques, afin de déterminer les effets sur le système immunitaire. Le prélèvement de <1 mL de sang dans un tube à microhématocrite est suffisant pour les deux dernières analyses (Feldman et coll., 2000); on emploiera une gouttelette de sang étalée sur une lame de verre pour la leucocytémie différentielle (c.-à-d. pourcentages de lymphocytes de petite taille, de lymphocytes de grande taille, de neutrophiles, de polynucléaires œsinophiles, de monocytes et de macrophages).

Chaque essai doit comporter un témoin négatif, et il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux. Le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif (v. section 4), mais recommandé. La mesure de l'infectivité à partir d'un ou de plusieurs organes, tissus ou liquides organiques (p. ex., sang ou urine) choisis des rongeurs exposés à chaque traitement doit être effectuée au terme de l'essai si les techniques d'analyse le permettent (v. section 5). Il n'est pas obligatoire de procéder à d'autres mesures de l'infectivité et de la clairance au cours de l'essai (p. ex., toutes les semaines), mais de telles mesures seraient utiles pour surveiller le début et la progression de toute infectivité pendant l'essai. Les spécifications propres aux essais à concentration unique (§ 3.3.1) ou à concentrations multiples (§ 3.3.2) sont résumées au tableau 14. Il convient de se conformer aux indications fournies aux sous-sections 3.3.1, 3.3.2, 3.4.5 et 3.4.6 lors du mélange de la matière d'essai et de son administration par

<sup>86</sup> Le régime alimentaire doit répondre aux besoins de l'espèce sur le plan des nutriments. Tout aliment non médicamenté du commerce qui répond aux normes minimales d'alimentation de l'espèce est acceptable (ASTM, 2000q).

**Tableau 14 Méthode recommandée pour un essai de pathogénicité et/ou de toxicité de  $\geq 21$  jours sur des rats ou des souris**

**Essai universel**

Méthode d'essai	— Modification de USEPA (1996o), <i>Microbial Pesticide Test Guidelines — Acute Oral Toxicity/Pathogenicity</i> , et de USEPA (1996p), <i>Microbial Pesticide Test Guidelines — Acute Pulmonary Toxicity/Pathogenicity</i> .
Type d'essai	— Essai visant à mesurer les effets nocifs sur la survie, le comportement et l'aspect (y compris lors de l'examen macroscopique et, au besoin, microscopique des tissus et organes) des rats ou des souris exposés par voie orale et/ou par inhalation (c.-à-d. par instillation nasale ou trachéale).
Régime d'administration des doses	— Une fois seulement, au début de l'essai.
Durée de l'essai	— $\geq 21$ jours.
Organismes d'essai	— Jeunes adultes d'une souche utilisée couramment en laboratoire; nombre égal de mâles et de femelles non gestantes, d'âge et de taille similaires, pour chaque traitement; acclimatation aux enceintes expérimentales et aux conditions de l'essai pendant $\geq 7$ jours avant la mise en route de l'essai.
Enceinte expérimentale	— Cage individuelle entièrement en métal, dont le fond a une superficie de $\geq 250$ cm <sup>2</sup> pour les rats et de $\geq 100$ cm <sup>2</sup> pour les souris.
Nombre de rongeurs par enceinte expérimentale	— 1
Température	— Moyenne quotidienne de $22 \pm 2$ °C.
Humidité relative	— 40–70 %.
Éclairage	— Incandescent ou fluorescent; intensité lumineuse de 500–1000 lux; photopériode : $12 \pm 1$ h de clarté et $12 \pm 1$ h d'obscurité; transition graduelle entre clarté et obscurité et vice versa.
Alimentation	— À volonté, sous forme d'aliments pour rongeurs du commerce, de la consistance appropriée.
Témoins	— Chaque essai doit inclure un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux; le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif.
Mode d'exposition	— Par voie orale (gavage) ou par inhalation, que l'essai soit à concentration unique ou à concentrations multiples.
DDM administrée par voie orale	— $10^8$ unités de la nouvelle substance microbienne, administrée sous forme de dose unique au début de l'essai (v. § 3.3.1.10).
DDM administrée par inhalation	— $10^8$ unités de la nouvelle substance microbienne, administrée sous forme de dose unique au début de l'essai (v. § 3.3.1.11).
Essai d'infectivité	— Exigé à la fin de l'essai si les techniques d'analyse le permettent; fondé sur les concentrations mesurées de la nouvelle substance microbienne dans des organes (p. ex., cœur, cerveau, reins, foie), tissus ou liquides organiques (p. ex., sang ou urine) choisis de rongeurs de chaque traitement, à la fin de l'essai; essai d'infectivité facultatif pendant l'essai.
Mesures	— Mesure de la température dans l'installation d'essai, maximum/minimum quotidiens ou en continu; humidité relative de l'installation au moins une fois par semaine; masse corporelle de chaque rongeur de chaque cage et de chaque traitement au début de l'essai, puis hebdomadairement par la suite; si les techniques d'analyse le permettent, concentration de la nouvelle substance microbienne dans la suspension aqueuse utilisée pour chaque traitement (y compris les témoins).

- Observations — Tous les jours, observation du taux de survie, du comportement (p. ex., léthargie, tremblements, convulsions, coma, profil de sommeil atypique) et de l'aspect (p. ex., lésions externes) de chaque animal; à la fin de l'essai, autopsie de tous les animaux morts pendant l'essai et de ceux qui ont survécu; examen post-mortem des lésions et anomalies apparentes (les changements peuvent inclure la nécrose des tissus ou organes, des hémorragies, etc.); au besoin, prélèvement de tissus choisis aux fins d'examen microscopiques ultérieurs.
- Paramètres biologiques — Survie, aspect (y compris au moment de l'autopsie pratiquée à la fin de l'essai) et comportement des spécimens de chaque enceinte expérimentale et de chaque traitement, au cours et au terme de l'essai.
- Validité de l'essai — Essai invalide si la survie est de <90 % dans le groupe témoin négatif à la fin de l'essai.

### ***Essai à concentration unique***

- Nombre de traitements — Au moins deux (DDM et témoin négatif); il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
- Nombre de répétitions — Au moins 10 cages par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
- Nombre de rongeurs par traitement — Au moins 10; nombre égal de mâles et de femelles.
- Mode d'exposition — Par voie orale (gavage) ou par inhalation (un mode d'exposition par essai).
- Paramètres statistiques — Pour chaque traitement : pourcentage de survie à la fin de l'essai; pourcentage de rongeurs ayant survécu et dont l'aspect (d'après les autopsies) et/ou le comportement sont atypiques, à la fin de l'essai.
- Comparaisons statistiques — DDM et témoin négatif à la fin de l'essai, pour détecter tout écart dans le pourcentage de survie et dans le pourcentage de rongeurs ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.

### ***Essai à concentrations multiples***

- Nombre de concentrations (ou nombre de traitements) — Au moins cinq, dont la DDM plus un témoin négatif; il est vivement recommandé de prévoir un témoin non infectieux, tandis que le recours à un témoin sur filtrat stérile est facultatif, mais recommandé.
- Nombre de répétitions — 10 cages par concentration (traitement), y compris chaque traitement témoin.
- Nombre de rongeurs par traitement — 10; 5 mâles et 5 femelles par traitement.
- Mode d'exposition — Par voie orale (gavage) ou par inhalation (un mode d'exposition par essai).
- Paramètres statistiques — Pour chaque traitement : pourcentage de survie à la fin de l'essai; pourcentage de rongeurs ayant survécu et dont l'aspect (d'après les autopsies) et/ou le comportement sont atypiques, à la fin de l'essai; si les données le permettent,  $DL_{50} \geq 21$  jours et  $DE_{50} \geq 21$  jours en regard de l'aspect et/ou du comportement atypiques, DSEO/DMEO.
- Comparaisons statistiques — Concentrations expérimentales et témoin négatif à la fin de l'essai, pour détecter tout écart dans le pourcentage de survie et dans le pourcentage de rongeurs ayant survécu et dont le comportement est anormal et/ou dont des organes ou des tissus ont un aspect atypique; si un ou plus d'un autre témoin est utilisé, comparaisons similaires avec le témoin négatif.
-

voie orale ou par inhalation. Si possible, on devrait quantifier la dose quotidienne de la nouvelle substance microbienne administrée aux rongeurs de chaque traitement au début de l'essai (v. § 3.5).

Dans un essai à concentration unique, la DDM de la matière d'essai est administrée selon un seul mode d'exposition [c.-à-d. par voie orale (gavage) ou par inhalation; v. § 3.4.5 et 3.4.6]. Les animaux sont logés dans des cages individuelles et au moins 10 rongeurs sont exposés à chaque traitement<sup>87</sup>. Si l'on procède à un essai à concentrations multiples, on devrait mesurer séparément les effets de chacun de ces modes d'exposition (v. § 3.2). La décision quant au mode à privilégier dépend de la façon dont la nouvelle substance microbienne sera appliquée dans l'environnement (p. ex., sous forme de pulvérisation aérienne ou de solide répandu sur l'eau ou le sol) et de la voie ou des voies par lesquelles la substance viendra vraisemblablement en contact avec les petits mammifères. Dans chaque essai à concentrations multiples, il faut utiliser la matière d'essai à sa DDM et à des concentrations plus faibles pour chaque mode d'exposition; on doit aussi prévoir un témoin négatif et, selon le plan de l'étude, un ou plus d'un autre témoin (v. section 4). La présente méthode d'essai biologique exige au moins cinq concentrations expérimentales ainsi qu'un témoin ou plus dans le cas d'un essai à concentrations multiples.

Les paramètres biologiques sont fondés sur la survie, de même que sur le comportement et sur l'aspect (y compris au moment de l'autopsie et à l'issue des examens microscopiques des lésions) du ou des groupes de rongeurs de chaque traitement. Le tableau 14 résume le type d'observations à effectuer chaque jour, tout au long de l'essai, quant au comportement et à l'aspect des animaux de chaque traitement (dont ceux du témoin négatif et des autres témoins). Il convient de porter une attention particulière aux signes suivants : tremblements, convulsions, léthargie, autres changements neurologiques, faible gain de poids, diarrhée, etc. (USEPA, 1996o,p). Au cours de ces observations quotidiennes, tout rongeur mort doit faire l'objet

<sup>87</sup> Il serait souhaitable d'utiliser plus de 10 animaux (p. ex., 3 groupes de 10 animaux par traitement), ce qui faciliterait les comparaisons statistiques des paramètres (p. ex., pour chaque traitement, pourcentage de survie, pourcentage de rongeurs ayant survécu et dont le comportement et/ou l'aspect sont atypiques). Toutefois, conformément à USEPA (1996o,p), il ne s'agit pas d'un élément indispensable des essais sur des rongeurs.

d'une autopsie, et il faut procéder à un examen macroscopique détaillé de ses tissus et organes externes et internes (p. ex., peau, muqueuses, oreille externe, cavité buccale, voies respiratoires, tractus gastro-intestinal, foie, cœur, rate et appareil urinaire). À la fin de l'essai, chacun des rongeurs encore vivants de chaque traitement (et du traitement témoin négatif) doit être mis à mort et soumis au même type d'examen macroscopique. Si des lésions sont relevées au cours de l'autopsie, ou si des signes cliniques de maladie ont été observés pendant l'essai ou au terme de celui-ci, on devrait prélever des échantillons de tissus ou d'organes et les préserver dans du formaldéhyde neutre tamponné (10 %) en vue d'examen microscopiques ultérieurs, le cas échéant. Les procédures habituelles d'histopathologie incluent normalement des sections des poumons, du foie, de la rate, des reins, de l'intestin grêle, du gros intestin et du cœur. Si l'on observe des symptômes neurologiques et/ou comportementaux, on devrait aussi prélever des sections du cerveau en vue d'un examen histopathologique ultérieur, si nécessaire. Les responsables des essais devraient consulter les guides décrivant les procédures normalisées d'autopsie applicables aux rongeurs (p. ex., Greaves et Faccini, 1984; Feldman et Seely, 1988) au moment des préparatifs et de la conduite de ces examens post-mortem.

Au cours de l'évaluation des résultats d'un essai à concentration unique, il convient de se pencher sur la relation apparente, le cas échéant, entre l'exposition à la matière d'essai et l'incidence ou la gravité de toutes les anomalies observées au cours de ce traitement (c.-à-d. la DDM) par rapport au témoin négatif. Une telle comparaison devrait être effectuée pour toutes les observations, dont les suivantes : changements comportementaux, aspect atypique pendant l'essai, masse corporelle, mortalité, changements macroscopiques notés pendant l'autopsie, histopathologie (USEPA, 1996o,p).

Si l'essai à concentration unique comprend des séries de répétitions (p. ex., 3 groupes de 10 rongeurs par traitement), les paramètres statistiques qui suivent devraient être établis et comparés au terme de l'essai<sup>88</sup> :

<sup>88</sup> Lorsque le cadre expérimental d'un essai à concentration unique est restreint à un seul groupe de 10 rongeurs par traitement (un animal par cage), conformément à USEPA (1996o,p), les données ne se prêtent pas à des comparaisons statistiques. Par contre, si l'on utilise des

- 1) pourcentage de survie des rongeurs exposés à chaque traitement;
- 2) pourcentage d'animaux de chaque traitement présentant un comportement atypique (p. ex., tremblements, convulsions, léthargie);
- 3) pour chaque traitement, pourcentage de rongeurs dont un ou plusieurs organes ou tissus ont un aspect anormal (p. ex., lésions externes ou internes, œil opaque ou présentant des signes d'hémorragie, foie décoloré ou plus volumineux).

Une fois établies pour la DDM et pour tout traitement témoin autre que le négatif, les valeurs respectives de ces paramètres devraient être comparées à celles établies pour le témoin négatif, à l'aide d'un test statistique permettant des comparaisons par paire, comme le *test de Student*. Il convient de consulter les méthodes statistiques que renferme le guide des essais d'écotoxicité d'Environnement Canada (2004d) pour déterminer les paramètres à mesurer ainsi que pour choisir les méthodes à appliquer.

Les paramètres statistiques décrits ci-dessus s'appliquent également aux essais à concentrations multiples. Si les données le permettent (v. § 3.3.2), la  $DL_{50} \geq 21$  jours de la matière d'essai devrait être établie, de même que la pente de sa courbe et ses limites de confiance de 95 %. Dans la mesure du possible, on devrait aussi calculer la  $DE_{50} \geq 21$  jours d'après l'aspect et/ou le comportement atypiques de chaque rongeur de chaque traitement, ainsi que la pente de sa courbe et ses limites de confiance de 95 %. EC (2004d) renferme des conseils sur les logiciels (et leur application) à utiliser pour déterminer la  $DL_{50}$  ou la  $DE_{50}$ . Toujours si les données le permettent, il faudrait calculer et déclarer la DSEO et la DMEO en regard de la survie après 21 jours, de même que les valeurs à attribuer à l'aspect et/ou au comportement atypiques des rongeurs. En outre, on devrait consulter ce document lors du choix des méthodes statistiques applicables aux données tirées de l'étude sur l'aspect (y compris celui observé lors des autopsies) et le comportement des rongeurs.

---

groupes multiples d'animaux (p. ex., 3 par traitement), il est possible de procéder à des comparaisons entre les traitements.

#### 14.2.3 Autres méthodes ou procédures

On trouve dans Siegel et Shaddock (1992) de l'information utile sur les anciennes méthodes et procédures applicables aux essais de laboratoire conçus pour mesurer les effets d'AAM sur des mammifères. Ce document, qui est principalement axé sur les essais d'infection et de toxicité aiguë, traite d'essais spécifiques en matière de sécurité pour les mammifères, de même que des éléments à prendre en compte lors de l'acquisition et de l'hébergement de rongeurs et d'autres espèces de petits mammifères.

La United States Food and Drug Administration exploite le Center for Biologics Evaluation and Research (CBER; voir <http://www.fda.gov/cber/about.htm>) et le Center for Drug Evaluation and Research (CDER; voir <http://www.fda.gov/cder>). Le CBER réglemente les substances biologiques et, de concert avec le CDER, établit des directives sur les méthodes et procédures applicables aux essais sur les effets écologiques que ces substances peuvent avoir sur les rongeurs et d'autres organismes d'essai. Les sites Web de ces deux centres offrent donc de l'information utile au sujet des essais visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques de certaines nouvelles substances microbiennes sur les rongeurs et d'autres espèces de petits mammifères.

Dans le cadre de ses lignes directrices de la série 885 sur les pesticides microbiens, l'USEPA a publié deux méthodes d'essai biologique permettant de mesurer les effets néfastes à long terme d'AAM sur des rongeurs. USEPA (1996t) décrit un essai de  $\geq 90$  jours prévoyant l'administration quotidienne (par voie orale ou par inhalation) de la matière d'essai à de jeunes rats ou souris adultes et comportant l'observation des effets pathogènes et/ou toxiques et de l'infectivité de cette matière, tandis qu'USEPA (1996u) décrit un essai servant à mesurer les effets de l'administration quotidienne d'un AAM par voie orale sur la fertilité et la reproduction de rats ou de souris et sur le développement fœtal de leurs descendants jusqu'à la naissance. Chacune de ces méthodes mérite d'être envisagée, en plus de la méthode recommandée à la sous-section 14.2.2, s'il semble justifié de procéder à des essais additionnels sur de petits mammifères domestiques. Ce pourrait être le cas si l'on sait ou suppose qu'une nouvelle substance microbienne exige une longue période d'incubation avant d'avoir des effets pathogènes. S'il est établi que des micro-organismes semblables à ceux présents dans la

matière d'essai ont des effets sur la reproduction ou le développement de petits mammifères dans certains cas et que les premiers essais menés avec cette substance, conformément à la méthode décrite à la sous-section 14.2.2, portent à croire qu'il faut procéder à d'autres évaluations de son innocuité pour l'environnement, on pourrait appliquer la méthode décrite dans USEPA (1996u) sous forme d'essai à concentration unique ou à concentrations multiples.

La méthode d'essai biologique servant à évaluer la toxicité pour le développement des rats et des lapins, décrite dans ASTM (2000s), pourrait s'avérer utile pour la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne sur les fœtus de petits mammifères. Elle offre l'avantage d'être relativement brève (20 jours pour les rats et 29 jours pour les lapins), tout en permettant d'étudier les effets d'une matière d'essai sur des femelles en gestation à partir du moment de l'implantation de l'embryon jusqu'à la formation des principaux systèmes d'organes. On trouve également dans ASTM (2000s) une description des procédures et conditions applicables à cet essai à concentrations multiples.

L'ASTM a aussi publié des méthodes normalisées pour la conduite d'essais de toxicité de 90 jours sur des rats domestiques, essais qui servent à mesurer les effets de produits chimiques sur la survie, le comportement et l'aspect (anomalies observées à l'oeil nu et au cours de l'autopsie pratiquée le jour 90) des organismes d'essai. Ces méthodes prévoient l'administration de la matière d'essai par voie orale (ASTM, 2000q) ou par inhalation (ASTM, 2000r), sont conçues sous forme d'essais à concentrations multiples et incluent la DSEO entre autres paramètres. Les spécifications décrites dans ces deux documents peuvent être appliquées à l'essai de  $\geq 21$  jours recommandé à la sous-section 14.2.2. Avec les modifications qui conviennent à de nouvelles substances microbiennes (et conformément aux modifications décrites à la sous-section 14.2.2), l'une

ou l'autre de ces méthodes d'essai de 90 jours pourrait remplacer la méthode décrite à la sous-section 14.2.2 si l'on souhaite recueillir de l'information sur les effets d'une exposition prolongée de petits mammifères à une nouvelle substance microbienne.

L'ASTM a élaboré une méthode normalisée pour déterminer la toxicité chronique de matières d'essai administrées à des rats par voie orale (ASTM 2000t). Cet essai à concentrations multiples, qui fait appel à de jeunes rats sevrés 3 semaines auparavant, prévoit l'administration quotidienne (ou 5 jours par semaine) de la matière d'essai par voie orale (gavage ou régime alimentaire) pendant un an. Au terme de l'essai, on prélève des échantillons d'urine et de sang aux fins des analyses et on procède à des autopsies en vue de détecter les pathologies macroscopiques et microscopiques. Cette méthode permet de détecter des effets nocifs qui exigent une longue période de latence ou qui doivent s'accumuler avant de devenir manifestes (ASTM, 2000t). S'il est nécessaire de recueillir de l'information sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne donnée, on pourrait adapter facilement à cette fin la méthode normalisée applicable aux essais de toxicité chronique par voie orale chez les rats.

Si l'on souhaite obtenir des renseignements sur les effets écologiques potentiels d'une nouvelle substance microbienne sur une espèce particulière de petit mammifère sauvage (v. § 14.2.1), on pourrait envisager de capturer des spécimens sur le terrain et de les transporter au laboratoire aux fins des essais. Deux documents de l'USEPA (1996v et 1996nn) renferment des directives pour les essais sur les mammifères sauvages. Après avoir acclimaté ces animaux aux conditions du laboratoire et vérifié qu'ils sont en bonne santé, on peut procéder aux essais sur les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne selon la méthode recommandée à la sous-section 14.2.2.

## Conseils sur les rapports à produire

### Repères

- *Il faut satisfaire aux exigences en matière de renseignements précisées dans EC et SC (2001) pour les essais de laboratoire sur les effets pathogènes et/ou toxiques de nouvelles substances microbiennes au moment de soumettre à Environnement Canada les rapports renfermant les résultats de chaque essai.*
- *Il faudrait également se conformer aux exigences des Principes de l'OCDE de bonnes pratiques de laboratoire (OCDE, 1998a).*
- *Outre les exigences mentionnées ci-dessus, chaque rapport d'essai devrait renfermer les renseignements que requièrent la méthode d'essai biologique ou les lignes directrices appliquées aux essais de pathogénicité et/ou de toxicité pour une espèce donnée d'organisme d'essai.*

La sous-section 4.2.7.1 des *Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : organismes* (EC et SC, 2001) renferme des indications sommaires relatives à la déclaration des résultats des essais de laboratoire visant à déterminer les effets nocifs de nouvelles substances microbiennes sur des plantes et des animaux aquatiques et terrestres. On y précise ce qui suit :

*Le déclarant doit fournir tous les renseignements nécessaires pour décrire complètement et exactement les procédures d'essai, et toutes les données, informations et analyses nécessaires à Environnement Canada pour aboutir à une conclusion indépendante. Ces renseignements doivent inclure la justification du choix des espèces et des méthodes d'essai et une analyse statistique des différences entre le groupe exposé à un danger maximal et les groupes de contrôle.*

À tout le moins, il faut se conformer à ces exigences en matière de renseignements lorsqu'on soumet à Environnement Canada les rapports d'étude décrivant chaque essai mené dans le contexte du présent guide.

Les Principes de BPL de l'OCDE renferment des directives sur la déclaration des résultats des études

de laboratoire comportant des essais de sécurité non cliniques de diverses substances, dont des produits chimiques industriels, des pesticides et des substances renfermant des organismes vivants ou constituées d'organismes vivants (OCDE, 1998a). Les exigences du *Règlement sur les RSN* (Gouvernement du Canada, 1997) en matière de BPL ne s'appliquent qu'aux produits chimiques, polymères et biopolymères; elles ne visent pas les micro-organismes. Il n'en demeure pas moins que les Principes de BPL de l'OCDE devraient être appliqués aux essais de laboratoire sur des organismes vivants (y compris les micro-organismes) tant que la Loi et/ou le *Règlement sur les RSN* n'incluront pas d'exigences relatives aux données sur ces organismes. La sous-section 6.9 du présent guide, intitulée « Établissement du rapport sur les résultats de l'étude », résume les éléments à inclure dans chaque rapport final — pour satisfaire aux Principes de BPL de l'OCDE — sur les résultats des essais visant à mesurer les effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne sur un organisme d'essai (hôte) particulier.

L'USEPA (1996a) a aussi établi ses propres exigences en regard des lignes directrices de sa série 885. D'après les directives de l'USEPA (OPPTS 885.001) en matière de renseignements à fournir, chaque rapport soumis dans le cadre de la série 885 doit satisfaire aux exigences précisées aux sous-titres suivants (USEPA, 1996a) :

- 1) exigences générales,
- 2) fond et forme,
- 3) résumé des résultats de l'essai,
- 4) description des procédures d'essai,
- 5) méthodes statistiques.

Toutes les lignes directrices de la série 885 applicables à une méthode d'essai biologique particulière incluent une section sur les rapports à produire pour chaque essai. Cette section décrit précisément les détails que l'on doit ou devrait fournir quant aux procédures, conditions et résultats des

essais, outre les exigences générales précisées dans OPPTS 885.001 (USEPA, 1996a). Chaque rapport final de chaque essai mené conformément aux lignes directrices (modifiées ou non; v. sections 9 à 14) de la série 885 devrait être conforme aux exigences de l'USEPA (1996a) et à celles précisées dans les lignes directrices (USEPA, 1996c-v).

Chacune des méthodes d'essai biologique d'Environnement Canada mentionnées dans le présent guide comporte une section intitulée « Rapport à produire » ou encore, dans des rapports plus anciens, « Procès-verbal de l'essai », par exemple. Cette section dresse la liste des exigences minimales à satisfaire en matière de rapport et précise séparément d'autres exigences ou les données qu'il convient de conserver dans les dossiers<sup>89</sup>. Les exigences ont trait aux conditions, aux procédures et aux résultats des essais qui doivent ou devraient faire partie du rapport propre à l'essai ou d'un rapport général applicable à tous les essais menés conformément à une méthode d'essai biologique particulière; dans certains cas (p. ex., notes de laboratoire et données consignées tout au long de

l'essai), il peut s'agir d'éléments à conserver pendant au moins 5 ans. Lors de l'établissement et du parachèvement du rapport d'essai, il convient de se conformer aux exigences de chaque méthode d'essai biologique (modifiée ou non aux fins des essais) mise au point par Environnement Canada pour la mesure des effets pathogènes et/ou toxiques d'une nouvelle substance microbienne sur une espèce choisie de plante ou d'animal aquatique ou terrestre (v. sections 9 à 14).

Certaines des méthodes recommandées ou considérées aux sections 9 à 14 ont été normalisées par l'ASTM (2000c-t), l'ISO (1998, 1999a,b), l'OCDE (1998c,d,e, 2000b,c, 2002b) ou l'USEPA (1995, 1996c-m, 1996o-v, 1996gg-nn, 2000, 2002a,b). Qu'il s'agisse de méthodes normalisées ou de lignes directrices, toutes comportent des exigences en matière de renseignements à fournir concernant les procédures, conditions et résultats de chaque essai. Chaque rapport final établi aux termes de ces méthodes ou lignes directrices devrait être conforme à ces exigences.

---

<sup>89</sup> Les exigences supplémentaires concernent les données à inclure dans le rapport d'essai ou dans un rapport général, ou encore les éléments à conserver pendant au moins 5 ans. Font exception les premières méthodes d'essai biologique (c.-à-d. celles publiées en 1990 et en 1992), où tous les éléments à déclarer étaient regroupés sous le même titre.



## Ouvrages cités

- ACIA (Agence canadienne d'inspection des aliments), *Normes sur le confinement des installations vétérinaires*, S. Fry (dir.), publication n° 1921/E, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Ottawa (Ont.) (2001).
- Anderson, G., « Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (Gulf of Mexico) — Grass Shrimp », *Biological Report* 82 (11.35), TR EL-82-4, mars 1985, US Fish and Wildlife Service, Lafayette, LA (1985).
- AOACI (Association of Official Analytical Chemists International), « Official Methods of Analysis of AOAC International — Vol.1, *Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs* », W. Horowitz (dir.), 17<sup>e</sup> éd., AOAC International, Gaithersburg, MD (2000).
- APHA, AWWA et WEF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20<sup>e</sup> éd., L. Clesceri, A. Greenber et A. Eaton (dir.), APHA, AWWA et WEF, Washington, DC (1998).
- ARLA (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire), *Bonnes pratiques de laboratoire*, Directive d'homologation DIR98-01, 27 juillet 1998, 43 p., Santé Canada, Ottawa (Ont.) (1998).
- , *Directive sur l'homologation des agents antiparasitaires microbiens et de leurs produits*, Directive d'homologation DIR2001-02, 30 mars 2001, 109 p., Santé Canada, Ottawa (Ont.) (2001).
- ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians », E 729-96, p. 213–233, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, Vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000a).
- , « Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Aqueous Ambient Samples and Effluents with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians », E 1192-97, p. 440–452, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, Vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000b).
- , « Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with *Lemna gibba* G3 », E 1415-91, p. 784–793, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000c).
- , « Standard Guide for Conducting Renewal Phytotoxicity Tests with Freshwater Emergent Macrophytes », E 1841-96, p. 1315–1323, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000d).
- , « Standard Guide for Conducting Sexual Reproduction Tests with Seaweeds », E 1498-92, p. 869–879, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000e).
- , « Standard Guide for Conducting Static 96-h Toxicity Tests with Microalgae », E 1218-97a, p. 514–527, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000f).
- , « Standard Guide for Conducting Toxicity Tests with Bioluminescent Dinoflagellates », E 1924-97, p. 1450–1460, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000g).
- , « Standard Guide for Conducting *Daphnia magna* Life-Cycle Toxicity Tests », E 1193-97, p. 453–470, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000h).
- , « Standard Guide for Conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Mollusks », E 1022-94, p. 320–337, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000i).
- , « Standard Guide for Conducting Life-Cycle Toxicity Tests with Saltwater Mysids », E 1191-97, p. 424–439, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000j).
- , « Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Polychaetous Annelids », E 1611-99 p. 991–1016, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000k).

- , « Standard Guide for Conducting Acute, Chronic, and Life-Cycle Toxicity Tests with Polychaetous Annelids », E 1562-94, p. 924–942, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000l).
- , « Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes », E 1241-98, p. 528–555, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000m).
- , « Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests », E 1963-98, p. 1464–1483, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000n).
- , « Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* », E 1676-97, p. 1040–1058, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000o).
- , « Standard Practice for Conducting Subacute Dietary Toxicity Tests with Avian Species », E 857-87, p. 243–247, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000p).
- , « Standard Test Method for Conducting a 90-Day Oral Toxicity Study in Rats », E 1372-95, p. 739–743, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000q).
- , « Standard Test Method for Conducting a Subchronic Inhalation Toxicity Study in Rats », E 1373-92, p. 744–747, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000r).
- , « Standard Test Method for Assessing Developmental Toxicity in Rats and Rabbits », E 1483-92, p. 863–866, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000s).
- , « Standard Test Method for Chronic Oral Toxicity Study in Rats », E 1619-95, p. 1017–1020, dans : *2000 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, ASTM, Conshohocken, PA (2000t).
- Ball, B.V., B.J. Pye, N.L. Carreck, D. Moore et R.P. Bateman, « Laboratory Testing of a Mycopenicillin on Non-Target Organisms: The Effects of an Oil Formulation of *Metarhizium flavoviride* Applied to *Apis mellifera* », *Biocontrol Science and Technology*, 4:289–96 (1994).
- Becker-van Slooten, K., S. Campiche et J. Tarradellas, « Research in Support of the Environment Canada Collembolan Toxicity Test Method with *Folsomia candida* for Assessment of Contaminated Soils », rapport final, 73 p., préparé par EPFL (Lausanne, Suisse) pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) (2003).
- Bell, T.A., et D.V. Lightner, *A Handbook of Normal Panaeid Shrimp Histology*, The World Aquaculture Society, Inc., Lawrence, KS (1988).
- Belliveau, B., et Z. Vaituzis, « Regulatory Aspects of Microbial Pest Control Agents (MPCA) — Environmental Risk Assessment », communication présentée lors de l'atelier sur l'homologation des biopesticides aux termes de l'ALÉNA, tenu à Arlington, VA, 13–15 novembre 2001, 15 p. (2001). Consultable à l'adresse <http://users.adelphia.net/~nagahiro/rutgers/HTML%20Docs/BBelliveau-Mic%20Env%20As.htm>.
- Briggs, J.D., et D.C. Sands, « Overview: The Effects of Microbial Pest Control Agents on Nontarget Organisms », p. 685–688, dans : M.A. Levin, R.J. Seidler et M. Rogul (dir.), *Microbial Ecology — Principles, Methods, and Applications*, McGraw-Hill Inc., New York, NY (1992).
- Budd, G., et W.J. Rayment, « *Macoma balthica* — Baltic tellin », Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-Programme (en ligne), Marine Biological Association of the United Kingdom, Plymouth, RU (consultable à l'adresse <http://www.marlin.ac.uk>) (2001).
- Butcher, G.D., et R.D. Miles, *Avian Necropsy Techniques*, Document VM-81, 4 p., Department of Large Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL (1996).
- Butt, T.M., et M.S. Goettel, « Bioassays of Entomogenous Fungi », p. 141–191, dans : A. Navon et K.R.S. Ascher (dir.), *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*, CAB International, New York, NY (2000).

- Campbell, C.L., et D.C. Sands, « Testing the Effects of Microbial Agents on Plants », p. 689–705, dans : M.A. Levin, R.J. Seidler et M. Rogul (dir.), *Microbial Ecology — Principles, Methods, and Applications*, McGraw-Hill Inc., New York, NY (1992).
- CCPC (Conseil canadien de protection des animaux), *Manuel sur le soin et l'utilisation d'animaux d'expérimentation*, vol. 1, 2<sup>e</sup> éd., 212 p., E.D. Olfert, B.M. Cross et A.A. McWilliam (dir.), Bradda Printing, Ottawa (Ont.) (1993).
- Chinchar, V.G., « Ranaviruses (Family Iridoviridae): Emerging Cold-Blooded Killers », *Archives of Virology*, 147:447–470 (2002).
- Dean-Ross, D., « Applicability of Chemical Risk Assessment Methodologies to Risk Assessment for Genetically Engineered Micro-organisms », *Recombinant DNA Tech. Bull.*, 9(1):16–28 (1986).
- Dhingra, O.D., et J.B. Sinclair, *Basic Plant Pathology Methods — Second Edition*, CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL (1995).
- Donegan, K., et B. Lighthart, *Bioassay Protocol for Lethal and Sublethal Effects of Fungal Pathogens on Chrysoperla carnea (Neuroptera: Chrysopidae)*, rapport EPA/600/3-91/025, Environmental Research Laboratory, USEPA, Corvallis, OR (1991).
- Douville, M., *Test Procedures for Assessing the Pathogenicity and Toxicity of Microorganisms to Aquatic and Terrestrial Wildlife in Laboratory Exposures: State-of-the-Art Review*, novembre 2001, rapport technique établi pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (Ont.), 153 p. + ann. (2001).
- EC (Environnement Canada), *Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur Daphnia spp.*, rapport SPE 1/RM/11, 61 p. [y compris les modifications apportées en mai 1996], Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1990a).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel*, rapport SPE 1/RM/9, 61 p. [y compris les modifications apportées en mai 1996], Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1990b).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines (Gasterosteus aculeatus)*, rapport SPE 1/RM/10, 49 p. [y compris les modifications apportées en mars 2000], Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1990c).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de toxicité sur la bactérie luminescente Photobacterium phosphoreum*, rapport SPE 1/RM/24, 67 p., Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1992a).
- , *Méthode d'essai biologique : essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce Selenastrum capricornutum*, rapport SPE 1/RM/25, 43 p. [y compris les modifications apportées en novembre 1997], Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1992b).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de reproduction et de survie sur le cladocère Ceriodaphnia dubia*, rapport SPE 1/RM/21, 78 p. [y compris les modifications apportées en novembre 1997], Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1992c).
- , *Méthode d'essai biologique : essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)*, rapport SPE 1/RM/27, 109 p. Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1992d).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens*, rapport SPE 1/RM/26, 99 p. [y compris les modifications apportées en octobre 1998], Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1992e).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule*, rapport SPE 1/RM/22, 70 p. [y compris les modifications apportées en novembre 1997], Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1992f).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de toxicité sur des salmonidés aux premiers stades de leur cycle biologique (truite arc-en-ciel, saumon coho ou saumon de l'Atlantique)*, rapport SPE 1/RM/28, 104 p. [y compris les modifications apportées en janvier 1995], Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1992g).

- , *Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques*, rapport SPE 1/RM/29, 128 p. + ann., Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1994).
- , « Workshop on Guidance for Notification of Hazard Information on Microbial Products of Biotechnology Under the Canadian Environmental Protection Act », Gatineau (Qué.), 13–14 novembre 1995, rapport sommaire, 22 p. + ann., Division des substances nouvelles, Direction de l'évaluation des produits chimiques commerciaux, janvier 1996, Ottawa (Ont.) (1996).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (Chironomus tentans ou Chironomus riparius) dans les sédiments*, rapport SPE 1/RM/32, 133 p., Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1997a).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole Hyalella azteca dans les sédiments*, rapport SPE 1/RM/33, 122 p., Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1997b).
- , *Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'un sédiment pour des amphipodes marins ou estuariens*, rapport SPE 1/RM/35, 60 p., Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1998a).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de toxicité sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique*, rapport SPE 1/RM/28, 2<sup>e</sup> éd., 104 p., Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1998b).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole, Lemna minor*, rapport SPE 1/RM/37, 107 p., Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1999a).
- , *Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats*, rapport SPE 1/RM/34, 209 p., Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1999b).
- , *Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez Daphnia magna*, rapport SPE 1/RM/14, 2<sup>e</sup> éd., 23 p., Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (2000a).
- , *Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel*, rapport SPE 1/RM/13, 2<sup>e</sup> éd., 23 p., Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (2000b).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des vers polychètes spionides (Polydora cornuta) dans les sédiments*, rapport SPE 1/RM/41, 135 p., Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (2001a).
- , *Revised Procedures for Adjusting Salinity of Effluent Samples for Marine Sublethal Toxicity Testing Conducted Under Environmental Effects Monitoring (EEM) Programs*, rapport inédit, novembre 2001, 9 p., Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Ottawa (Ont.) (2001b).
- , *Méthode d'essai biologique : méthode de référence servant à déterminer la toxicité des sédiments à l'aide d'une bactérie luminescente dans un essai en phase solide*, rapport SPE 1/RM/42, 61 p., Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (2002).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol (titre provisoire)*, rapport SPE 1/RM/45 (en préparation), Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (2004a).
- , *Méthode d'essai biologique : essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre Eisenia andrei, Eisenia fetida ou Lumbricus terrestris*, rapport SPE 1/RM/43 (en préparation), Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (2004b).
- , « *Méthode d'essai biologique : essai de mesure de la survie et de la reproduction de collemboles exposés à des contaminants dans le sol (titre provisoire)*, rapport SPE 1/RM/47 (en préparation), Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (2004c).

- , *Document d'orientation sur les méthodes statistiques permettant de déterminer les paramètres des essais de toxicité* (titre provisoire), rapport SPE 1/RM/46 (en préparation) Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (2004d).
- EC et SC (Environnement Canada et Santé Canada), *Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : organismes — En conformité avec le Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (1999), rapport SPE M-455, décembre 2001, 141 p., ISBN 0-660-18687-X, Ottawa (Ont.), [voir le site <http://www.ec.gc.ca/substances/> pour obtenir une version non officielle] (2001).
- Edginton, A., *Review of Amphibian Culturing and Toxicity Testing Procedures*, préparé pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, octobre 2001, 64 p., Environnement Canada, Ottawa (Ont.) (2001).
- Elston, R.A., J.H. Beattie, C. Friedman, R.P. Hedrick et M.L. Kent, « Pathology and Significance of Fatal Inflammatory Bacteremia in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* », *J. Fish Dis.* 10:121–132 (1987).
- Feldman, D.B., et J.C. Seely, *Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988).
- Feldman, B.F., J.G. Zinkl et N.C. Jain, *Schalm's Veterinary Hematology*, Lippincott, Williams and Williams, New York, NY (2000).
- Fisher, S.W., et J.D. Briggs, « Testing of Microbial Pest Control Agents in Nontarget Insects and Acari », p. 761–777, dans : M.A. Levin, R.J. Seidler et M. Rogul (dir.), *Microbial Ecology — Principles, Methods, and Applications*, McGraw-Hill, Inc., New York, NY (1992).
- Fisher, J.P., et M.S. Myers, « Fish Necropsy », p. 543–549 (ch. 32), dans : G.K. Ostrander (dir.), *The Laboratory Fish*, Academic Press, New York, NY (2000).
- Gouvernement du Canada, *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles*, partie II.1, *Substances nouvelles qui sont des organismes*, pris en application de la partie 6, intitulée *Substances biotechnologiques animées*, de la LCPE (1999) (articles 104–115), Ottawa (Ont.) [voir le site <http://lois.justice.gc.ca/fr/C-15.31/DORS-94-260/index.html> pour obtenir une version non officielle; le règlement peut également être consulté à l'adresse <http://www.ec.gc.ca/substances/>] (1997).
- , *Directives pour la déclaration et les essais de substances nouvelles : organismes*, Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999), août 2001 Environnement Canada et Santé Canada, ISBN 0-660-186578, Ottawa (Ont.), [voir le site <http://www.ec.gc.ca/substances/> pour obtenir une version non officielle] (2001).
- Greaves, P., et J.M. Faccini, *Rat Histopathology: A Glossary for Use in Toxicity and Carcinogenicity Studies*, Elsevier Press, Amsterdam and New York (1984).
- Hajek, A.E., et M.S. Goettel, « Guidelines for Evaluating Effects of Entomopathogens on Non-Target Organisms », p. 847–868, ch. X, dans : L.A. Lacey et H.K. Kaya (dir.), *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Kluwer Academic Publishers, Pays-Bas (2000).
- Hanley, A.V., Z.Y. Huang et W.L. Pett, « Effects of Dietary Transgenic Bt Corn Pollen on Larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella* », *J. Apicultural Res.*, 42(4):77–81 (2003).
- Hird, D.W., S.L. Diesch, R.G. McKinnell, E. Gorham, F.B. Martin, S.W. Kurtz et C. Dubrovlny, « *Aeromonas hydrophila* in Wild-Caught Frogs and Tadpoles (*Rana pipiens*) in Minnesota », *Lab. Anim. Sci.*, 31:166–169 (1981).
- ISO (Organisation internationale de normalisation), *Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (Eisenia fetida) – Partie 2 : Détermination des effets sur la reproduction*, ISO 11268-2, Genève, Suisse (1998).
- , *Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis de Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)*, ISO/FDIS 10706, version finale, 18 p. Genève, Suisse (1999a).
- , *Qualité du sol — Inhibition de la reproduction de Collembola (Folsomia candida) par des polluants du sol*, ISO 11267, 16 p. Genève, Suisse (1999b).

- , *Evaluation of Genotoxicity Using Amphibia Larvae (Xenopus laevis, Pleurodeles waltl)*, DRAFT document, 18 p. Genève, Suisse (2001).
- James, R.R., et B. Lighthart, *Bioassay for Testing the Lethal Effects of Bacterial Pathogens on the Predatory Beetle Hippodamia convergens (Coleoptera: Coccinellidae)*, rapport EPA/600/3-90/090, publication du NTIS n° PB91-127795, Environmental Research Laboratory, USEPA, Corvallis, OR (1990).
- , *Protocol for Testing the Effects of Fungal Pesticides on Nontarget Beetles Using Hippodamia convergens (Coleoptera: Coccinellidae)*, rapport EPA/600/R-92/160, publication du NTIS n° PB92-217488, Environmental Research Laboratory, USEPA, Corvallis, OR (1992).
- Katoh, J., « Outline of the Safety Evaluation Standards for Microbial Pesticides in Japan », résumé inédit (avec traduction partielle en anglais), *Guidance on Test Data for Safety Evaluation of Microbial Pesticides for Application for Registration*, Ministère de l'Agriculture, des Forêts et des Pêches, notification 9 NohSan n° 5090, 29 août 1997, Tokyo, Japon (2001).
- Kerwin, J.L., « Testing the Effects of Micro-organisms on Birds », p. 729–44, dans : M.A. Levin, R.J. Seidler et M. Rogul (dir.), *Microbial Ecology — Principles, Methods, and Applications*, McGraw-Hill, Inc., New York, NY (1992).
- Kerwin, J.L., D.A. Dritz et R.K. Washino, « Nonmammalian Safety Tests for *Lagenidium giganteum* (Oömycetes: Lagenidiales) », *J. Econ. Entomol.* 81:158–171 (1988).
- Laidlaw, W.M.R., « Mechanical Aids to Improve the Speed and Sensitivity of Plant Virus Diagnosis by the Biological Test Method », *Annals of Applied Biology*, 108(2):309–318 (1986).
- , « A New Method for Mechanical Virus Transmission and Factors Affecting its Sensitivity », *Bulletin-OEPP*, 17(1):81–90 (1987).
- O'Rourke, D.P., et T.W. Schultz, « Biology and Diseases of Amphibians », p. 793–826, dans : J.G. Fox et coll. (dir.), *Laboratory Animal Medicine*, 2° éd., Academic Press, New York, NY (2002).
- OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), *Guides révisés pour les systèmes de vérification du respect des Bonnes pratiques de laboratoire*, n° 2 (révisé), Principes de l'OCDE de Bonnes pratiques de laboratoire (tels que révisés en 1997), — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, OCDE/GD(95)66, Monographie sur l'environnement n° 110, Direction de l'environnement, Paris, France (1995a).
- , *Directives révisées pour la conduite d'inspections de laboratoire et de vérification d'études*, n° 3 (révisé) — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, OCDE/GD(95)67, Monographie sur l'environnement n° 111, Direction de l'environnement, Paris, France (1995b).
- , *Directives pour la préparation de rapports d'inspection en matière de BPL*, n° 9 — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, OCDE/GD(95)114, Monographie sur l'environnement n° 115, Direction de l'environnement, Paris, France (1995c).
- , *Application des Principes de BPL aux systèmes informatiques*, n° 10 — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, OCDE/GD(95)115, Monographie sur l'environnement n° 116, Direction de l'environnement, Paris, France (1995d).
- , *Les principes de l'OCDE de Bonnes pratiques de laboratoire* (tels que révisés en 1997), n° 1 — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, ENV/MC/CHEM(98)17, Direction de l'environnement, Paris, France (1998a).
- , *Le rôle et les responsabilités du donneur d'ordre lors de l'application des Principes de BPL*, n° 11 — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, ENV/MC/CHEM(98)16, Direction de l'environnement, Paris, France (1998b).
- , *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques — Daphnia magna, essai de reproduction*, essai n° 211, Direction de l'environnement, Paris, France (1998c).
- , *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques — Abeille domestique, essai de toxicité aiguë par voie orale*, essai n° 213, Direction de l'environnement, Paris, France (1998d).

- , *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques — Abeille domestique, essai de toxicité aiguë par contact*, essai n° 214, Direction de l'environnement, Paris, France (1998e).
- , *Assurance qualité et BPL*, n° 4 (révisé) — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, ENV/JM/MONO(99)20, Direction de l'environnement, Paris, France (1999a).
- , *Respect des Principes de BPL par les fournisseurs d'équipements de laboratoire*, n° 5 (révisé) — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, ENV/JM/MONO(99)21, Direction de l'environnement, Paris, France (1999b).
- , *Application des Principes de BPL aux études sur le terrain*, n° 6 (révisé) — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, ENV/JM/MONO(99)22, Direction de l'environnement, Paris, France (1999c).
- , *Application des Principes de BPL aux études à court terme*, n° 7 (révisé) — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, ENV/JM/MONO(99)23, Direction de l'environnement, Paris, France (1999d).
- , *Rôle et responsabilités du directeur de l'étude dans les travaux sur les BPL*, n° 8 (révisé) — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, ENV/JM/MONO(99)24, Direction de l'environnement, Paris, France (1999e).
- , *Recommandations concernant la demande et la réalisation d'inspection et de vérifications d'études dans un autre pays*, n° 12 — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, ENV/JM/MONO(2000)3, Direction de l'environnement, Paris, France (2000a).
- , *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques — Poisson, essai sur la croissance des juvéniles*, essai n° 215, janvier 2000, Paris, France (2000b).
- , *OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Proposal for a New Guideline — Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/andrei)*, version provisoire, janvier 2000, Paris, France (2000c).
- , *Application des Principes de BPL de l'OCDE à l'organisation et la conduite des études multi-site*, n° 13 — Série sur les principes de bonnes pratiques de laboratoire et vérification du respect de ces principes, ENV/JM/MONO(2002)9, Direction de l'environnement, Paris, France (2002a).
- , *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals — Lemna sp. Growth Inhibition Test*, proposition révisée en vue de l'élaboration d'une nouvelle version des lignes directrices 221, ébauche révisée, juillet 2002, Paris, France (2002b).
- 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 (C.-B.) (1982).
- SC (Santé Canada), *Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire – Ébauche de la 3<sup>e</sup> édition*, 20 septembre 2001, Ottawa (Ont.) (2001).
- SC et USEPA (Santé Canada et United States Environmental Protection Agency), « Proposal to Update Non-Target Plant Toxicity Testing Under NAFTA », exposé du Groupe consultatif scientifique, 27–29 juin 2001, présentation conjointe de Santé Canada (T. Kuchnicki et D. François, ARLA) et de l'USEPA (M. Davy, R. Petrie et J. Smrcek, OPPTS), 158 p. (2001).
- Scroggins, R.P., J.A. Miller, A.I. Borgmann et J.B. Sprague, « Sublethal Toxicity Findings by the Pulp and Paper Industry for Cycles 1 and 2 of the Environmental Effects Monitoring Program », *Water Qual. Res. J. Canada*, 37(1):21–48 (2002a).
- Scroggins, R., G. van Aggelen et J. Schroeder, « Monitoring Sublethal Toxicity in Effluent Under the Metal Mining EEM Program », *Water Qual. Res. J. Canada*, 37(1):279–294 (2002b).
- Sewall, D.K., et B. Lighthart, *Standard Practice for Conducting Fungal Pathogenicity on the Predatory Mite, Metaseiulus occidentalis (Acarina: Phytoseiidae)*, rapport EPA/600/3-89/046, Environmental Research Laboratory, USEPA, Corvallis, OR (1989).
- , *Standard Practice for Conducting Fungal Pathogenicity on the Lepidopteran Egg Parasite Trichogramma pretiosum (Hymenoptera:*

- Trichogrammatidae*), rapport EPA/600/3-90/069, publication du NTIS n° PB90-263849/AS, Environmental Research Laboratory, USEPA, Corvallis, OR (1990).
- Shuster, C.N., et A.F. Eble, « Techniques in Visualization of Organ Systems in Bivalve Mollusks », *Proc. Natl. Shellfish Assoc.*, 52:13–24 (1961).
- Siegel, J.P., et J.A. Shadduck, « Testing the Effects of Microbial Pest Control Agents on Mammals », p. 745–759, dans : M.A. Levin, R.J. Seidler et M. Rogul (dir.), *Microbial Ecology — Principles, Methods, and Applications*, McGraw-Hill, Inc., New York, NY (1992).
- Spacie, A., « Testing the Effects of Microbial Agents on Fish and Crustaceans », p. 707–728, dans : M.A. Levin, R.J. Seidler et M. Rogul (dir.), *Microbial Ecology — Principles, Methods, and Applications*, McGraw-Hill Inc., New York, NY (1992).
- Suter II, G.W., « Application of Environmental Risk Analysis to Engineered Organisms », p. 211–219, dans : H.O. Halvorson, D. Pramer et M. Rogul (dir.), *Engineered Organisms in the Environment: Scientific Issues*, American Society for Microbiology, Washington, DC (1985).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), *Guidance Manual: Bedded Sediment Bioaccumulation Tests*, 2<sup>e</sup> éd., rapport EPA/600/R-93/183, septembre 1993, Newport, OR (1993).
- , *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to West Coast Marine and Estuarine Organisms*, rapport EPA/600/R-95/136, 661 p., Office of Research and Development, USEPA, Washington, DC (1995).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Overview for Microbial Pest Control Agents*, OPPTS 885.0001, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-280, février 1996, 18 p., Washington, DC (1996a).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Background for Nontarget Organism Testing of Microbial Pest Control Agents*, OPPTS 885.4000, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-328, février 1996, 23 p., Washington, DC (1996b).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Nontarget Plant Studies, Tier I*, OPPTS 885.4280, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-335, février 1996, 4 p., Washington, DC (1996c).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Freshwater Aquatic Invertebrates Testing, Tier I*, OPPTS 885.4240, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-333, février 1996, 5 p., Washington, DC (1996d).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Estuarine and Marine Animal Testing, Tier I*, OPPTS 885.4280, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-334, février 1996, 6 p., Washington, DC (1996e).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Range Testing, Tier III*, OPPTS 885.4650, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-343, février 1996, 3 p., Washington, DC (1996f).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Freshwater Fish Testing, Tier I*, OPPTS 885.4200, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-332, février 1996, 5 p., Washington, DC (1996g).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Fish Life Cycle Studies, Tier III*, OPPTS 885.4700, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-344, février 1996, 3 p., Washington, DC (1996h).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Nontarget Insect Testing, Tier I*, OPPTS 885.4340, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-336, février 1996, 4 p., Washington, DC (1996i).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Honey Bee Testing, Tier I*, OPPTS 885.4380, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-337, février 1996, 2 p., Washington, DC (1996j).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Avian Oral, Tier I*, OPPTS 885.4050, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-329, février 1996, 4 p., Washington, DC (1996k).



- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Avian Inhalation Test, Tier I*, OPPTS 885.4100, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-330, février 1996, 4 p., Washington, DC (1996l).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Avian Chronic Pathogenicity and Reproduction Test, Tier III*, OPPTS 885.4600, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-342, février 1996, 4 p., Washington, DC (1996m).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Background — Mammalian Toxicity/Pathogenicity/Infectivity*, OPPTS 885.3000, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-314, février 1996, 6 p., Washington, DC (1996n).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Acute Oral Toxicity/Pathogenicity*, OPPTS 885.3050, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-315, février 1996, 6 p., Washington, DC (1996o).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Acute Pulmonary Toxicity/Pathogenicity*, OPPTS 885.3150, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-317, février 1996, 6 p., Washington, DC (1996p).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Acute Injection Toxicity/Pathogenicity*, OPPTS 885.3200, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-318, février 1996, 6 p., Washington, DC (1996q).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Acute Dermal Toxicity/Pathogenicity*, OPPTS 885.3100, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-316, février 1996, 4 p., Washington, DC (1996r).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Acute Toxicity, Tier II*, OPPTS 885.3550, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-322, février 1996, 2 p., Washington, DC (1996s).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Subchronic Toxicity/Pathogenicity*, OPPTS 885.3600, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-232, février 1996, 4 p., Washington, DC (1996t).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Reproductive/Fertility Effects*, OPPTS 885.3650, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-324, février 1996, 4 p., Washington, DC (1996u).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Wild Mammal Testing, Tier I*, OPPTS 885.4150, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-331, février 1996, 3 p., Washington, DC (1996v).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Aquatic Ecosystem Test*, OPPTS 885.4750, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-345, février 1996, 2 p., Washington, DC (1996w).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Background for Microbial Pesticides Testing*, OPPTS 885.5000, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-056, février 1996, 4 p., Washington, DC (1996x).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Expression in a Freshwater Environment*, OPPTS 885.5300, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-339, février 1996, 3 p., Washington, DC (1996y).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Expression in a Marine or Estuarine Environment*, OPPTS 885.5400, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-312, février 1996, 3 p., Washington, DC (1996z).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Expression in a Terrestrial Environment*, OPPTS 885.5200, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-338, février 1996, 4 p., Washington, DC (1996aa).
- , *Ecological Effects Test Guidelines — Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies*, OPPTS 850.1000, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-113, ébauche publique, avril 1996, 13 p., Washington, DC (1996bb).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Nature of the Residue in Animals*, OPPTS 885.2250, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances

- (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-303, février 1996, 1 p., Washington, DC (1996cc).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Nature of the Residue in Plants*, OPPTS 885.2200, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-302, février 1996, 2 p., Washington, DC (1996dd).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Analytical Methods — Plants*, OPPTS 885.2300, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-304, février 1996, 2 p., Washington, DC (1996ee).
- , *Microbial Pesticide Test Guidelines — Analytical Methods — Animals*, OPPTS 885.2350, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-305, février 1996, 2 p., Washington, DC (1996ff).
- , *Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., Tiers I and II*, OPPTS 850.4400, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-156, ébauche publique, avril 1996, 8 p., Washington, DC (1996gg).
- , *Ecological Effects Test Guidelines — Earthworm Subchronic Toxicity Tests*, OPPTS 850.6200, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-167, ébauche publique, avril 1996, 11 p., Washington, DC (1996hh).
- , *Ecological Effects Test Guidelines — Honey Bee Acute Contact Toxicity*, OPPTS 850.3020, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-147, ébauche publique, avril 1996, 6 p., Washington, DC (1996ii).
- , *Ecological Effects Test Guidelines — Honey Bee Toxicity of Residues on Foliage*, OPPTS 850.3030, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-148, ébauche publique, avril 1996, 4 p., Washington, DC (1996jj).
- , *Ecological Effects Test Guidelines — Avian Dietary Toxicity Test*, OPPTS 850.2200, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-140, ébauche publique, avril 1996, 10 p., Washington, DC (1996kk).
- , *Ecological Effects Test Guidelines — Avian Reproductive Test*, OPPTS 850.2300, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-141, ébauche publique, avril 1996, 14 p., Washington, DC (1996ll).
- , *Ecological Effects Test Guidelines — Avian Acute Oral Toxicity Test*, OPPTS 850.2100, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-139, ébauche publique, avril 1996, 9 p., Washington, DC (1996mm).
- , *Ecological Effects Test Guidelines — Wild Mammal Acute Toxicity*, OPPTS 850.2400, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances (OPPTS), rapport EPA 712-C-96-142, ébauche publique, avril 1996, 3 p., Washington, DC (1996nn).
- , *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates — Second Edition*, rapport EPA/600/R-99/064, 192 p., Washington, DC (2000).
- , *Methods for Assessing the Chronic Toxicity of Marine and Estuarine Sediment-Associated Contaminants with the Amphipod Leptocheirus plumulosus — First Edition*, rapport EPA/600/R-01/020, Washington, DC (2001).
- , *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Water to Freshwater Organisms*, 4<sup>e</sup> éd., Office of Water, rapport EPA-821-R-02-013, 350 p., USEPA, Washington, DC (2002a).
- , *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms*, 3<sup>e</sup> éd., rapport EPA-821-R-02-014, 486 p., Office of Water, USEPA, Washington, DC (2002b).

## Annexe A

### Méthodes d'essai biologiques et documents d'orientation publiés par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada<sup>90</sup>

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
<b>A. Méthodes d'essai biologique universelles</b>			
Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/9	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines ( <i>Gasterosteus aculeatus</i> )	SPE 1/RM/10	Juillet 1990	Mars 2000
Essai de létalité aiguë sur <i>Daphnia</i> spp.	SPE 1/RM/11	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de reproduction et de survie sur le cladocère <i>Ceriodaphnia dubia</i>	SPE 1/RM/21	Février 1992	Novembre 1997
Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule	SPE 1/RM/22	Février 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité sur la bactérie luminescente <i>Photobacterium phosphoreum</i>	SPE 1/RM/24	Novembre 1992	—
Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce <i>Selenastrum capricornutum</i>	SPE 1/RM/25	Novembre 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/26	Décembre 1992	Octobre 1998
Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)	SPE 1/RM/27	Décembre 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité sur des salmonidés aux premiers stades de leur cycle biologique (truite arc-en-ciel, saumon coho ou saumon de l'Atlantique)	SPE 1/RM/28 1 <sup>re</sup> édition	Décembre 1992	Janvier 1995
Essai de toxicité sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique	SPE 1/RM/28 2 <sup>e</sup> édition	Juillet 1998	—
Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes ( <i>Chironomus tentans</i> ou <i>Chironomus riparius</i> ) dans les sédiments	SPE 1/RM/32	Décembre 1997	—

<sup>90</sup> Ces documents sont vendus à l'adresse suivante : Publications de la Protection de l'environnement, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0H3, Canada. Pour obtenir de plus amples renseignements ou pour formuler des commentaires, prière de communiquer avec le directeur de la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0H3, Canada.

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
<b>A. Méthodes d'essai biologique universelles (suite)</b>			
Essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole <i>Hyaella azteca</i> dans les sédiments	SPE 1/RM/33	Décembre 1997	—
Essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole, <i>Lemna minor</i>	SPE 1/RM/37	Mars 1999	—
Essai de survie et de croissance des vers polychètes spionides ( <i>Polydora cornuta</i> ) dans les sédiments	SPE 1/RM/41	Décembre 2001	—
Essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre <i>Eisenia andrei</i> , <i>Eisenia fetida</i> ou <i>Lumbricus terrestris</i>	SPE 1/RM/43	Avril 2004	—
Essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol (titre provisoire)	SPE 1/RM/45	Septembre 2004?	—
Essai de mesure de la survie et de la reproduction de collemboles exposés à des contaminants dans le sol (titre provisoire)	SPE 1/RM/47	2005	—
<b>B. Méthodes de référence<sup>91</sup></b>			
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 1 <sup>re</sup> édition	Juillet 1990	Mai 1996, décembre 2000
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 2 <sup>e</sup> édition	Décembre 2000	—
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez <i>Daphnia magna</i>	SPE 1/RM/14 1 <sup>re</sup> édition	Juillet 1990	Mai 1996, décembre 2000
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez <i>Daphnia magna</i>	SPE 1/RM/14 2 <sup>e</sup> édition	Décembre 2000	—
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'un sédiment pour des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/35	Décembre 1998	—

<sup>91</sup> Dans le présent contexte, une *méthode de référence* est une méthode d'essai biologique spécifique en vue de la réalisation d'un essai de toxicité, respectant une série de conditions expérimentales et de modes opératoires décrits avec précision dans un document écrit. Contrairement à d'autres méthodes d'essai biologique génériques (polyvalentes ou « universelles ») publiées par Environnement Canada, les *méthodes de référence* sont souvent réservées aux essais associés à des règlements particuliers.

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
<b>C. Documents d'orientation</b>			
Méthode de référence servant à déterminer la toxicité des sédiments à l'aide d'une bactérie luminescente dans un essai en phase solide	SPE 1/RM/42	Avril 2002	—
Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence	SPE 1/RM/12	Août 1990	—
Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques	SPE 1/RM/29	Décembre 1994	—
Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiment dopé avec un produit toxique de référence	SPE 1/RM/30	Septembre 1995	—
Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats	SPE 1/RM/34	Décembre 1999	—
Guide des essais de pathogénicité et de toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les organismes aquatiques et terrestres	SPE 1/RM/44	Mars 2004	—
Document d'orientation sur les méthodes statistiques permettant de déterminer les paramètres des essais de toxicité (titre provisoire)	SPE 1/RM/46	Octobre 2004?	—

**Administration centrale et bureaux régionaux d'Environnement Canada****Administration centrale**

351, boulevard Saint-Joseph  
Place Vincent-Massey  
Gatineau (Qué.)  
K1A 0H3

**Région de l'Ontario**

4905, rue Dufferin, 2<sup>e</sup> étage  
Downsview (Ontario)  
M3H 5T4

**Région de l'Atlantique**

15<sup>e</sup> étage, Queen Square  
45, chemin Alderney  
Dartmouth (N.-É.)  
B2Y 2N6

**Région des Prairies et du Nord**

Bureau 210, Twin Atria n<sup>o</sup> 2  
4999, 98<sup>e</sup> Avenue  
Edmonton (Alb.)  
T6B 2X3

**Région du Québec**

8<sup>e</sup> étage  
105, rue McGill  
Montréal (Qué.)  
H2Y 2E7

**Région du Pacifique et du Yukon**

401, rue Burrard  
Vancouver (C.-B.)  
V6C 3S5

## Membres du comité consultatif scientifique

### Membres du comité

Jan Beardall  
 Direction des substances nouvelles  
 Division de la biotechnologie  
 Environnement Canada  
 14<sup>e</sup> étage, Place Vincent-Massey  
 351, boulevard Saint-Joseph  
 Gatineau (Qué.) K1A 0H3  
 Téléphone : (819) 997-1641  
 Télécopieur : (819) 953-7155  
 Courriel : [jan.beardall@ec.gc.ca](mailto:jan.beardall@ec.gc.ca)

Brian Belliveau  
 Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire  
 Division de l'évaluation sanitaire  
 Santé Canada  
 Immeuble Sir Charles-Tupper (660 5E1)  
 Ottawa (Ont.) K1A 0K9  
 Téléphone : (613) 736-3737  
 Télécopieur : (613) 736-3505  
 Courriel : [Brian.Belliveau@hc-sc.gc.ca](mailto:Brian.Belliveau@hc-sc.gc.ca)

Manon Bombardier  
 Section de l'élaboration et de l'application des méthodes  
 Centre de technologie environnementale  
 Environnement Canada  
 3439, River Road Sud  
 Ottawa (Ont.) K1A 0Y9  
 Téléphone : (613) 990-9544  
 Télécopieur : (613) 990-0173  
 Courriel : [bombardier.manon@etc.ec.gc.ca](mailto:bombardier.manon@etc.ec.gc.ca)

Ken Doe  
 Laboratoire de toxicologie  
 Section de la qualité environnementale  
 Centre des sciences de l'environnement,  
 région de l'Atlantique  
 Environnement Canada  
 B.P. 23005  
 Moncton (N.-B.) E1A 6S8  
 Téléphone : (506) 851-3486  
 Télécopieur : (506) 851-6608  
 Courriel : [Ken.Doe@ec.gc.ca](mailto:Ken.Doe@ec.gc.ca)

Kim Hibbeln  
 Direction des substances nouvelles  
 Division de la biotechnologie  
 Environnement Canada  
 14<sup>e</sup> étage, Place Vincent-Massey  
 351, boulevard Saint-Joseph  
 Gatineau (Qué.) K1A 0H3  
 Téléphone : (819) 994-6584  
 Télécopieur : (819) 953-7155  
 Courriel : [kim.hibbeln@ec.gc.ca](mailto:kim.hibbeln@ec.gc.ca)

Steve Holmes  
 Centre de foresterie des Grands Lacs  
 Service canadien des forêts  
 Ressources naturelles Canada  
 1219, rue Queen Est  
 Sault Ste. Marie (Ont.) P6A 2E5  
 Téléphone : (705) 541-5661  
 Télécopieur : (705) 541-5700  
 Courriel : [sholmes@NRCan.gc.ca](mailto:sholmes@NRCan.gc.ca)

Dave Kreutzweiser  
 Centre de foresterie des Grands Lacs  
 Service canadien des forêts  
 Ressources naturelles Canada  
 1219, rue Queen Est  
 Sault Ste. Marie (Ont.) P6A 2E5  
 Téléphone : (705) 541-5648  
 Télécopieur : (705) 541-5700  
 Courriel : [dkreutzw@nrca.gc.ca](mailto:dkreutzw@nrca.gc.ca)

Jim Louter  
 Direction des substances nouvelles  
 Division de la biotechnologie  
 Environnement Canada  
 14<sup>e</sup> étage, Place Vincent-Massey  
 351, boulevard Saint-Joseph  
 Gatineau (Qué.) K1A 0H3  
 Téléphone : (819) 997-6803  
 Télécopieur : (819) 953-7155  
 Courriel : [jim.louter@ec.gc.ca](mailto:jim.louter@ec.gc.ca)

Lesley Novak  
 Stantech Consulting Ltd.  
 361, promenade Southgate  
 Guelph (Ont.) N1G 3M5  
 Téléphone : (519) 836-6050  
 Télécopieur : (519) 836-2493  
 Courriel : [lnovak@stantec.com](mailto:lnovak@stantec.com)

David Palmer  
 Wildlife International, Ltd.  
 8598 Commerce Drive  
 Easton, MD 21601  
 Téléphone : (410) 822-8600  
 Télécopieur : (410) 822-0632  
 Courriel : [dpalmer@wildlifeinternational.com](mailto:dpalmer@wildlifeinternational.com)

Arthur Putt  
 Springborn Smithers Laboratories, Inc.  
 790 Main Street  
 Wareham, MA 02571  
 Téléphone : (508) 295-2550  
 Télécopieur : (508) 295-8107  
 Courriel : [aputt@springbornsmithers.com](mailto:aputt@springbornsmithers.com)

Rick Scroggins  
 Division des méthodes biologiques  
 Centre de technologie environnementale  
 Environnement Canada  
 335, River Road  
 Ottawa (Ont.) K1A 0H3  
 Téléphone : (613) 990-8569  
 Télécopieur : (613) 990-0173  
 Courriel : [scroggins.richard@etc.ec.gc.ca](mailto:scroggins.richard@etc.ec.gc.ca)

Vern Seligy  
 Section des substances mutagènes  
 Division de toxicologie environnementale  
 et professionnelle  
 Centre de l'hygiène du milieu  
 Santé Canada  
 Laboratoire 315A, localisateur postal 0803A  
 Ottawa (Ont.) K1A 0L2  
 Téléphone : (613) 952-5852  
 Télécopieur : (613) 941-4768  
 Courriel : [Vern\\_Seligy@hc-sc.gc.ca](mailto:Vern_Seligy@hc-sc.gc.ca)

Robert (Bob) Sherwood  
 IIT Research Institute  
 10 West 35th Street  
 Chicago, IL 60616  
 Téléphone : (312) 567-4845  
 Télécopieur : (312) 567-4852  
 Courriel : [rsherwood@iitri.org](mailto:rsherwood@iitri.org)

Zig Vaituzis  
 Microbial Pesticides Branch  
 Biopesticides and Pollution Prevention Division  
 United States Environmental Protection Agency  
 1200 Pennsylvania Ave., NW  
 Washington, DC 20460.0001  
 Téléphone : (703) 308-8676  
 Télécopieur : (703) 308-7026  
 Courriel : [Vaituzis.Zigridas@epamail.epa.gov](mailto:Vaituzis.Zigridas@epamail.epa.gov)

Scott Ward  
 ABC Laboratories  
 7200 East ABC Lane  
 Columbia, MO 65202  
 Téléphone : (573) 443-9042  
 Télécopieur : (573) 443-9089  
 Courriel : [wards@abclabs.com](mailto:wards@abclabs.com)

Hans Yu  
 Bureau de la biotechnologie et de la science  
 Direction générale des produits de santé et des aliments  
 Santé Canada  
 Immeuble #7, L2-6, localisateur postal 0702A  
 Pré Tunney  
 Ottawa (Ont.) K1A 0L2  
 Téléphone : (613) 948-5801  
 Télécopieur : (613) 957-0362  
 Courriel : [hans\\_yu@hc-sc.gc.ca](mailto:hans_yu@hc-sc.gc.ca)

### ***Groupe d'étude (co-auteurs)***

Fred Genthner  
 Gulf Ecology Division  
 United States Environmental Protection Agency  
 1 Sabine Island Drive  
 Gulf Breeze, FL 32561  
 Téléphone : (850) 934-9342  
 Télécopieur : (850) 934-2402  
 Courriel : [genthner.fred@epamail.epa.gov](mailto:genthner.fred@epamail.epa.gov)

Rosalind James  
 Bee Biology and Systematics Laboratory  
 Utah State University  
 USDA-ARS  
 5310 Old Main Hill  
 Logan, UT 84322-5310  
 Téléphone : (435) 797-2524  
 Télécopieur : (435) 797-0461  
 Courriel : [rjames@biology.usu.edu](mailto:rjames@biology.usu.edu)

George Lazarovits  
 Centre de recherche du Sud sur la phytoprotection  
 et les aliments  
 Agriculture et Agroalimentaire Canada  
 1391, rue Sandford  
 London (Ont.) N5V 4T3  
 Téléphone : (519) 457-1470  
 Télécopieur : (519) 457-3997  
 Courriel : [lazarovitsg@agr.gc.ca](mailto:lazarovitsg@agr.gc.ca)

Don McLeay (consultant principal)  
 McLeay Environmental Ltd.  
 2999, chemin Spring Bay  
 Victoria (C.-B.) V8N 5S4  
 Téléphone : (250) 472-2608  
 Télécopieur : (250) 472-2609  
 Courriel : [mcleayenvir@islandnet.com](mailto:mcleayenvir@islandnet.com)

Dean Percy  
 Collège de médecine vétérinaire  
 de l'Ontario – Pathobiologie  
 Université de Guelph  
 Guelph (Ont.) N1G 2W1  
 Téléphone : (519) 824-4120  
 Télécopieur : (519) 824-5930  
 Courriel : [dpercy@uoguelph.ca](mailto:dpercy@uoguelph.ca)

### ***Autorité scientifique***

Manon Bombardier  
 Section de l'élaboration et de l'application des méthodes  
 Centre de technologie environnementale  
 Environnement Canada  
 335, River Road  
 Ottawa (Ont.) K1A 0H3  
 Téléphone : (613) 990-9544  
 Télécopieur : (613) 990-0173  
 Courriel : [bombardier.manon@etc.ec.gc.ca](mailto:bombardier.manon@etc.ec.gc.ca)



## Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais de pathogénicité et/ou de toxicité\*

Colonne (nombre de concentrations entre 10,0 et 1,00 ou entre 1,00 et 0,10)\*\*

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

\* Modifié d'après Rocchini et coll. (1982).

\*\* Dans une colonne, on devrait choisir une série de cinq concentrations successives (au moins). 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 ou en fonction de la masse (p. ex., mg/kg) ou du volume (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 les concentrations plus largement espacées, puisqu'elles procureront une faible résolution des limites de confiance entourant toute valeur calculée à effet de seuil.