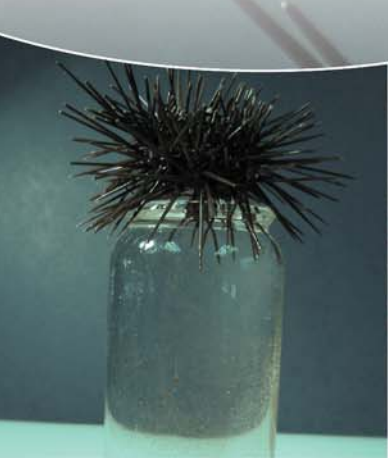




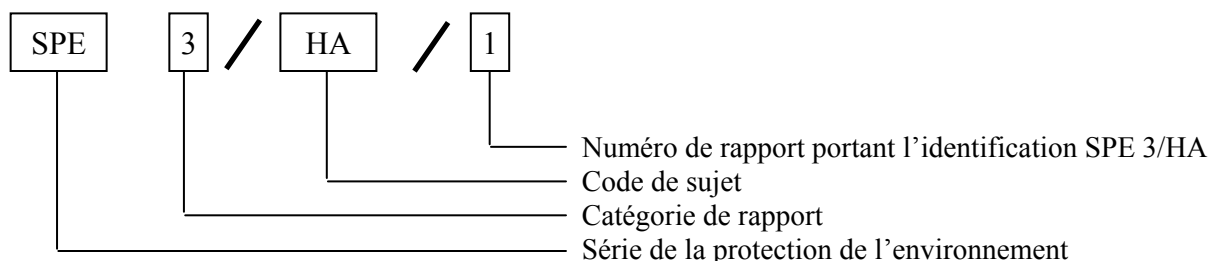
Méthode d'essai biologique : Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins globuleux et oursins plats)

SPE 1/RM/27 Deuxième édition – Février 2011
Direction générale de la science et de la technologie
Environnement 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 : Service des communications, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3.

Méthode d'essai biologique : Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins globuleux et oursins plats)

Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes
Direction générale de la science et de la technologie
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)

SPE 1/RM/27
Deuxième édition
Février 2011

Version imprimée
N° de cat. : En49-7/1-27F
ISBN 978-1-100-96588-8

Version PDF
N° de cat. : En49-7/1-27F-PDF
ISBN 978-1-100-96589-5

Le contenu de cette publication ou de ce produit peut être reproduit en tout ou en partie, et par quelque moyen que ce soit sous réserve que la reproduction soit effectuée uniquement à des fins personnelles ou publiques mais non commerciales, sans frais ni autre permission, à moins d'avis contraire.

On demande seulement :

- de faire preuve de diligence raisonnable en assurant l'exactitude du matériel reproduit;
- d'indiquer le titre complet du matériel reproduit et l'organisation qui en est l'auteur;
- d'indiquer que la reproduction est une copie d'un document officiel publié par le gouvernement du Canada et que la reproduction n'a pas été faite en association avec le gouvernement du Canada ni avec l'appui de celui-ci.

La reproduction et la distribution à des fins commerciales est interdite, sauf avec la permission écrite de l'administrateur des droits d'auteur de la Couronne du gouvernement du Canada, Travaux publics et Services gouvernementaux (TPSGC). Pour de plus amples renseignements, veuillez communiquer avec TPSGC au 613-996-6886 ou à droitdauteur.copyright@tpsgc-pwgsc.gc.ca.

Photos de la page couverture : © Environnement Canada

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par le ministre de l'Environnement, 2011

Also available in English

Commentaires

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

Richard P. Scroggins, chef
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Direction générale de la science
et de la technologie
Environnement Canada
335, River Road
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

Lisa Taylor, gestionnaire
Unité de l'élaboration et de l'application
des méthodes
Direction générale de la science
et de la technologie
Environnement Canada
335, River Road
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

This report is also available in English. For copies, please contact:

Communications Services
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. La mention d'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue ni une recommandation ni une approbation quant à l'emploi de ces produits de la part d'Environnement Canada. D'autres produits de valeur comparable peuvent être utilisés.

Résumé

Le présent document décrit les méthodes recommandées par Environnement Canada pour l'exécution d'un essai de toxicité sublétale en milieu marin avec des gamètes d'oursins globuleux ou d'oursins plats. Cette deuxième édition de la méthode SPE 1/RM27, publiée en 2011, remplace la première édition publiée en 1992, puis modifiée en 1997. Elle comporte de nombreuses modifications procédurales, de même que des conseils et des instructions à jour concernant la conduite de la méthode d'essai biologique.

Au cours de cet essai, on expose d'abord le sperme d'échinides à la substance ou à la matière d'essai. On ajoute ensuite des œufs d'échinides et on mesure le succès de la fécondation tout en maintenant l'exposition à une concentration constante de la substance ou de la matière d'essai. Le paramètre à mesurer est la diminution du succès de la fécondation, exprimée sous forme de concentration estimative causant un pourcentage précis d'inhibition (CI_p). L'essai demande peu de temps et compte parmi les essais de toxicité sublétale en milieu marin les plus sensibles. La survie des gamètes et le succès de la fécondation étant des éléments essentiels du cycle biologique, l'essai décrit ici constitue un instrument de mesure puissant et probant de la sublétalité. On peut utiliser, pour cet essai, au moins sept concentrations de la substance ou de la matière d'essai afin de déterminer le seuil à partir duquel s'exerce un effet, ou une seule concentration s'il s'agit d'un essai réglementaire à résultat unique (satisfaisant ou non satisfaisant).

*On recommande d'utiliser les espèces suivantes : l'oursin vert (*Strongylocentrotus droebachiensis*), qu'on trouve sur les côtes atlantique, pacifique et arctique du Canada, l'oursin violet du Pacifique (*S. purpuratus*) ou le clypéastre excentrique (*Dendraster excentricus*), qui vivent dans le Pacifique, l'oursin violet de l'Atlantique (*Arbacia punctulata*) et l'oursin blanc de Californie (*Lytechinus pictus*).*

Ce rapport présente les méthodes d'acclimatation et de maintien des échinides adultes en laboratoire pendant de longues périodes ou en vue de leur utilisation immédiate (adultes dont le frai est provoqué dans les trois jours suivant leur arrivée au laboratoire), de même que les procédures de collecte du sperme et des œufs nécessaires à l'essai. On y indique également les conditions et méthodes générales ou universelles à mettre en œuvre pour réaliser des essais visant à mesurer les effets d'un large éventail de substances ou de matières sur la fécondation chez les échinides. D'autres conditions et méthodes sont propres aux essais sur un ou plusieurs échantillons de substance chimique, d'effluent, d'eau réceptrice, d'éluviat, de lixiviat ou de liquide extrait de sédiments et de matières solides semblables. On a également inclus des directives concernant les installations d'essai, la manipulation et l'entreposage des échantillons, la préparation des solutions d'essai et la mise en route des essais, les conditions d'essais particulières, les observations et mesures appropriées, les paramètres des essais, les méthodes de calcul, la validation de l'essai et l'utilisation de toxiques de référence.

Abstract

Methods recommended by Environment Canada for performing a sublethal marine toxicity test using gametes obtained from sea urchins or sand dollars are described in this report. This second edition of EPS 1/RM27, published in 2011 supersedes the first edition that was published in 1992, and amended in 1997. It includes numerous procedural modifications as well as updated guidance and instructions to assist in performing the biological test method.

In the test, sperm are exposed to the substance or material being tested. Eggs are then added, and the success of fertilization under continued exposure to the same concentration of test substance or material is measured. The endpoint is decreased success of fertilization, described in terms of the concentration estimated to cause a specified percent inhibition (ICp). The test is quick and is among the most sensitive of marine sublethal toxicity tests. Because the gametes and the success of fertilization usually represent a sensitive part of the life cycle, this assay should be considered as a powerful and meaningful sublethal test. The test may be run with a minimum of seven concentrations of test substance or material to determine the threshold of effect, or with one concentration as a regulatory or pass/fail test.

*Recommended species for use in this test are the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) found on the Atlantic, Pacific and Arctic coasts of Canada, the Pacific purple sea urchin (*S. purpuratus*), or the eccentric sand dollar (*Dendraster excentricus*) found in the Pacific, the Atlantic purple sea urchin commonly called *Arbacia* (*Arbacia punctulata*), and the white sea urchin from California (*Lytechinus pictus*).*

Procedures are given for acclimating and holding adult echinoids in the laboratory for extended periods of time, for holding adult echinoids in the laboratory for immediate use (for adults who are spawned within 3 days of arrival at the laboratory), and for obtaining sperm and eggs for a test. General or universal conditions and procedures are outlined for testing a variety of materials or substances for their effect on echinoid fertilization. Additional conditions and procedures are specific for testing sample(s) of chemical, effluent, receiving water, leachate, elutriate, or liquid derived from sediment or similar solid material. Instructions are included for test facilities, handling and storing samples, preparing test solutions and initiating tests, specific test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints and methods of calculation, validation of the test and the use of reference toxicants.

Avant-propos

Le présent document fait partie d'une collection de **méthodes recommandées** pour la mesure et l'évaluation de l'effet ou des effets toxiques de l'exposition d'une seule espèce d'organisme aquatique ou terrestre à des échantillons de substances ou de matières toxiques ou susceptibles d'être toxiques, dans des conditions de laboratoire contrôlées et définies. Environnement Canada a évalué les méthodes recommandées et en préconise l'emploi :

- dans ses laboratoires 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 l'absence d'instructions plus précises, comme dans les règlements;
- en vue de l'élaboration d'instructions très explicites, comme celles qui pourraient être exigées dans un programme de réglementation 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 documents de la collection ont pour objet d'orienter les utilisateurs et de faciliter la mise en œuvre de méthodes cohérentes, pertinentes et intégrées en vue d'obtenir des données sur la toxicité, pour les organismes aquatiques ou terrestres, d'échantillons de substances ou de matières d'essai destinées à être dispersées dans l'environnement ou présentes dans l'environnement. Selon la ou les méthodes choisies et le milieu naturel visé, les substances ou matières dont la toxicité doit être mesurée pourraient comprendre des échantillons d'une substance ou d'un produit chimique, d'un effluent, d'un éluviat, d'un lixiviat, d'une eau réceptrice, d'un sédiment ou d'une matière particulaire semblable, ou encore d'un sol ou d'une matière particulaire semblable. On trouvera à l'annexe A du présent document la liste des méthodes d'essai biologique et des documents à l'appui publiés jusqu'à maintenant par Environnement Canada dans le cadre de cette collection.

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

Résumé	v
Abstract	vi
Avant-propos	vii
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations et des formules chimiques	xiv
Glossaire	xv
Remerciements	xxiv

Section 1

Introduction	1
1.1 Contexte.....	1
1.2 Caractéristiques générales et utilisation des échinides dans des essais.....	3

Section 2

Organismes d'essai	9
2.1 Espèces.....	9
2.2 Étapes du cycle biologique, taille et provenance des organismes.....	10
2.3 Maintien et acclimatation des adultes dans le laboratoire.....	12
2.3.1 Généralités.....	12
2.3.2 Réservoirs de maintien.....	15
2.3.3 Éclairage.....	15
2.3.4 Eau.....	17
2.3.5 Température.....	21
2.3.6 Oxygène dissous.....	21
2.3.7 pH.....	22
2.3.8 Alimentation.....	22
2.3.9 Nettoyage des réservoirs.....	23
2.3.10 Maladie et mortalité.....	23

Section 3

Système d'essai	25
3.1 Installations et appareils.....	25
3.2 Éclairage.....	25
3.3 Récipients d'essai.....	25
3.4 Eau témoin/de dilution.....	26

Section 4

Méthodes d'essai universelles	28
4.1 Préparation des solutions d'essai.....	28
4.1.1 Eau témoin/de dilution.....	28
4.1.2 Concentrations.....	32
4.1.3 Répétitions.....	33
4.1.4 Témoins.....	34

4.2	Mise en route et réalisation de l'essai	35
4.2.1	Collecte des gamètes en vue de l'essai	35
4.2.2	Préparation de suspensions types de gamètes	38
4.2.3	Rapport spermatozoïdes:œufs	40
4.2.4	Exposition des gamètes	43
4.3	Conditions de l'essai	45
4.3.1	Température	45
4.3.2	Salinité	45
4.3.3	Oxygène dissous et aération	47
4.3.4	pH.....	48
4.4	Observations et mesures	49
4.5	Paramètres et calculs.....	50
4.5.1	Validité de l'essai.....	50
4.5.2	Essais à concentrations multiples	50
4.5.3	Essais à concentration unique	55
4.6	Toxiques de référence	56
4.7	Considérations juridiques	58

Section 5

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité

de substances chimiques	59	
5.1	Propriétés, étiquetage et entreposage de l'échantillon.....	59
5.2	Préparation des solutions d'essai	59
5.3	Eau témoin/de dilution.....	60
5.4	Observations et mesures	61
5.5	Paramètre de l'essai et calculs	61

Section 6

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons d'effluent,

de lixiviat et d'élutriat	62	
6.1	Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons	62
6.2	Préparation des solutions d'essai	63
6.3	Eau témoin/de dilution.....	63
6.4	Observations et mesures au cours de l'essai	64
6.5	Paramètres de l'essai et calculs.....	64

Section 7

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons

d'eau réceptrice.....	66	
7.1	Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons	66
7.2	Préparation des solutions d'essai	66
7.3	Eau témoin/de dilution.....	66
7.4	Observations et mesures au cours de l'essai	67
7.5	Paramètres de l'essai et calculs.....	67

Section 8

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons de liquides extraits de sédiments ou de matières semblables	68
8.1 Généralités	68
8.1.1 Étiquetage, transport et entreposage des échantillons	69
8.1.2 Préparation des échantillons	69
8.1.3 Observations et mesures	70
8.1.4 Liquide provenant du sédiment témoin et du sédiment de référence	70
8.2 Essais sur des liquides provenant de sédiments et de solides semblables	71
8.2.1 Préparation des échantillons d'essai	72
8.2.2 Eau témoin/de dilution	73
8.2.3 Paramètres et calculs	73

Section 9

Rapports à produire	74
9.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai	74
9.1.1 Substance ou matière d'essai	74
9.1.2 Organismes d'essai	75
9.1.3 Installations et appareils	75
9.1.4 Eau témoin/de dilution	75
9.1.5 Méthode d'essai	75
9.1.6 Conditions expérimentales et modes opératoires	75
9.1.7 Résultats de l'essai	76
9.2 Exigences supplémentaires	76
9.2.1 Substance ou matière d'essai	76
9.2.2 Organismes d'essai	76
9.2.3 Installations et appareillage	77
9.2.4 Eau témoin/de dilution	77
9.2.5 Méthode d'essai	77
9.2.6 Conditions et méthodes d'essai	77
9.2.7 Résultats de l'essai	78
Références	79

Annexe A

Méthodes d'essai biologique et documents d'orientation publiés par l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada	88
--	-----------

Annexe B

Membres du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (en octobre 2009)	91
---	-----------

Annexe C

Administration centrale et bureaux régionaux d'Environnement Canada	94
--	-----------

Annexe D

Examen des différentes méthodes employées précédemment par des auteurs et organismes dans des essais sur la fécondation chez les oursins globuleux et les oursins plats..... 95

Annexe E

Bibliographie – Articles et documents supplémentaires se rapportant directement à l’essai canadien sur la fécondation chez les échinides..... 115

Annexe F

Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques..... 121

Liste des tableaux

1.	Période du frai, taille et température de maintien des adultes dont les gamètes serviront à l'essai	11
2.	Liste de contrôle des conditions et des méthodes recommandées pour le maintien et l'acclimatation des échinides	16
3.	Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour les essais	29
4.	Tableau récapitulatif des quantités de spermatozoïdes et d'œufs à ajouter à chaque récipient d'essai pour les trois volumes d'essai	41

Liste des figures

1.	Éléments à prendre en compte dans la détermination des conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de matières ou de substances	2
2.	Aspect général des échinides	4
3.	Caractéristiques des œufs fécondés et non fécondés	51
4.	Organigramme général de l'analyse statistique des données d'un essai à concentrations multiples en vue d'établir une CI _p	54

Liste des abréviations et des formules chimiques

A	ampère
ANOVA	analyse de la variance
°C	degré Celsius
CI _p	concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)
cm	centimètre
CMEO	concentration minimale avec effet observé
CSEO	concentration sans effet observé
CV	coefficient de variation
ET	écart type
g	gramme
g/kg	gramme par kilogramme
h	heure
HCl	acide chlorhydrique
IET	identification et évaluation de la toxicité
KCl	chlorure de potassium
L	litre
m	mètre
M _{MC}	mole(s) (concentration) marque de commerce
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
mS	millisiemens
N	normal
NaOH	hydroxyde de sodium
nm	nanomètre
OD	oxygène dissous (concentration)
s	seconde
SHS	saumure hypersaline
sp.	espèce
V	volt
× g	« fois la gravité » (exprimant la force centrifuge relative)
µg	microgramme
µmhos	micromhos
>	plus de
<	moins de
≥	plus de ou égal à
≤	moins de ou égal à
±	plus ou moins
~	environ
≅	approximativement égal à
/	par; peut aussi signifier « ou » (p. ex., eau témoin/de dilution)
%	pourcentage ou pour cent
‰	parties par millier

Glossaire

Nota : Toutes les définitions ci-dessous s'inscrivent dans le contexte des modes opératoires décrits dans le présent rapport; elles pourraient ne pas être adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit* (*doivent*) et *il faut* expriment 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

Acclimatation – Adaptation physiologique à une valeur précise d'un ou de plusieurs facteurs environnementaux, comme la température ou la *salinité*. Ce terme s'applique généralement à des conditions contrôlées en laboratoire.

Conductivité – Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de conduire un courant électrique. Cette capacité dépend des concentrations des ions en solution, de leur valence et de leur mobilité ainsi que de la température de la solution. La conductivité des eaux douces est mesurée à 25 °C et exprimée normalement en millisiemens par mètre (mS/m) ou en micromhos par centimètre (µmhos/cm) (1 mS/m = 10 µmhos/cm). La conductivité est une méthode normalisée de mesure de la *salinité*, le résultat étant normalement exprimé en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (‰).

Conformité – Respect des règlements ou des exigences gouvernementales en matière de permis.

Dispersant – Substance chimique abaissant la tension superficielle entre l'eau et une substance hydrophobe (p. ex., l'huile), ce qui facilite la dispersion de la substance ou de la matière dans l'eau sous forme d'émulsion.

Embryon – Jeune animal non développé, avant l'éclosion de l'œuf.

Émulsifiant – Substance chimique facilitant le mélange fin (sous forme de minuscules gouttelettes), dans l'eau, d'une substance normalement hydrophobe.

Euryhalin – Se dit d'un animal aquatique pouvant tolérer de grandes variations de la *salinité* sans subir de stress.

Floculation – Formation d'un précipité non consolidé (floc) dans une solution.

Gamètes – Œufs non fécondés ou spermatozoïdes obtenus d'échinides adultes.

Larve – Organisme récemment éclos dont les caractéristiques physiques diffèrent de celles observées chez l'adulte de la même espèce.

Lot – Groupe d'échinides adultes reçus en une seule fois d'un fournisseur, qui permettent de recueillir tous les *gamètes* censés être utilisés dans un essai toxicologique discret (y compris tout essai toxicologique de référence connexe). Ce terme peut aussi désigner les gamètes d'un seul mâle et d'une seule femelle ou d'un groupe de mâles et de femelles, recueillis aux mêmes fins.

Lux – Unité d'éclairage mesurant l'intensité lumineuse par mètre carré. 1 lux = 0,0929 pied-bougie et 1 pied-bougie = 10,76 lux. Pour convertir des lux en flux quantique [$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], il faut connaître la qualité spectrale de la source lumineuse. Les conditions de luminosité ou l'irradiance sont exprimées sous forme de flux quantique (débit de fluence photonique) dans la gamme de longueurs d'onde photosynthétiquement efficaces de ~400-700 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 (v. ASTM, 1999). Le facteur de conversion entre flux quantique et lux pour une lumière fluorescente en spectre continu (p. ex., Vita-Lite^{MC}, de Duro-Test^{MC}) est approximativement donné par la relation $1 \text{ lux} \cong 0,016 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (Deitzer, 1994; Sager et McFarlane, 1997).

Méthode de référence – Protocole conçu spécifiquement pour la mise en œuvre d'un essai de toxicité, c'est-à-dire une méthode d'essai biologique comportant 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. Contrairement à d'autres méthodes d'essai biologique polyvalentes (génériques) publiées par Environnement Canada, les méthodes de référence sont souvent réservées aux essais associés à des règlements particuliers.

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'éclairage (et de l'obscurité) sur 24 h.

Pourcentage (%) – Concentration exprimée en parties par centaine. Un pour cent (1 %) d'une matière ou d'une substance (p. ex., substance chimique, effluent, éluviat, lixiviat, eau réceptrice, eau de porosité) représente une unité ou une partie de celle-ci diluée dans l'eau pour constituer en tout 100 parties. Les concentrations peuvent être préparées selon un rapport de volume à volume ou de masse à masse et sont exprimées sous forme de pourcentage de la substance ou de la matière d'essai dans la solution finale.

Précipitation – Formation d'un solide (le précipité) à partir d'une partie ou de la totalité des constituants dissous d'une solution.

Prétraitement – Traitement d'un échantillon ou d'une dilution de cet échantillon avant d'y exposer les *gamètes*.

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

Salinité – Quantité totale (exprimée en grammes) de matière solide dissoute dans 1 kg d'eau. Elle est déterminée une fois que tous les carbonates ont été convertis en oxydes, que le bromure et l'iode 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 salinimètre, d'un conductimètre ou d'autres moyens (APHA et coll., 1989, 2005). La salinité est habituellement exprimée en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (‰).

Surveillance – Vérification périodique (p. ex., quotidienne, hebdomadaire, mensuelle, trimestrielle) de la qualité, ou collecte et communication de l'information. Dans le présent rapport, le terme désigne soit la vérification périodique et la mesure de certaines variables biologiques ou de variables relatives à la qualité de l'eau, soit le prélèvement d'échantillons d'effluent, de lixiviat, d'élutriat, d'eau réceptrice *marine/estuarienne* ou d'eau de porosité aux fins de la mesure de leur toxicité.

Turbidité – Mesure dans laquelle la clarté de l'eau est réduite par la présence de particules en suspension ou d'autres matières qui diffusent et absorbent la lumière plutôt que de la transmettre en ligne droite à travers l'échantillon. Cette caractéristique est généralement exprimée en unités de turbidité néphélométrique.

Termes relatifs aux matières ou substances d'essai

Eau d'amont – Eau de mer naturelle (p. ex., masse d'eau *estuarienne* ou *marine*) ne subissant pas l'influence de l'effluent (ou d'une autre matière ou substance d'essai), parce qu'elle en est éloignée en direction opposée au courant ou qu'elle s'en trouve suffisamment loin, perpendiculairement au courant.

Eau de dilution – Eau de mer ou eau saline servant à diluer une substance ou une matière d'essai à différentes concentrations aux fins des divers traitements associés aux essais de toxicité.

Eau de mer – Eau de mer qui se trouve ou qui est prélevée dans l'océan, dans la mer ou près des côtes, à un endroit où elle n'a pas subi de dilution appréciable par l'eau douce naturelle provenant du lessivage des terres.

Eau de mer reconstituée – Eau douce (désionisée ou distillée sous verre) à laquelle on a ajouté des sels de mer secs du commerce, des sels de qualité réactif ou de la *saumure hypersaline*, en une quantité suffisante pour obtenir une *salinité* (et un *pH*) d'eau de mer convenant au maintien des organismes et aux essais (*eau témoin/de dilution*).

Eau de porosité (ou *eau interstitielle*) – Eau occupant l'espace entre les particules d'un sédiment. La quantité d'eau de porosité s'exprime sous forme de *pourcentage* en poids du sédiment humide.

Eau déchlorée – Eau (généralement, eau potable municipale) ayant subi un traitement visant à éliminer le chlore et ses composés.

Eau désionisée – Eau qu'on a purifiée pour en extraire les ions en la faisant passer dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

Eau distillée – Eau ayant été traitée dans un appareil de distillation en verre borosilicaté ou autre matériau pour la débarrasser de ses impuretés.

Eau estuarienne – Eau saumâtre qui se trouve ou qui est prélevée dans les portions côtières des océans et qui résulte de la dilution mesurable de l'eau de mer par l'eau douce provenant du lessivage des terres.

Eau interstitielle – v. *eau de porosité*.

Eau produite – Eau salée la plupart du temps, associée à la production de pétrole et de gaz. Elle est issue de l'eau présente dans les gisements pétrolifères et gaziers et est produite en même temps que le pétrole et le gaz. En raison de sa forte salinité, elle peut soulever des problèmes environnementaux.

Eau réceptrice – Eau de mer naturelle (p. ex., masse d'eau *estuarienne* ou *marine*) dans laquelle ont été rejetées ou sont sur le point d'être rejetées des matières résiduelles (p. ex., eau immédiatement en « amont » du point de rejet). Il faut en donner une description étoffée pour préciser ce dont il s'agit.

Eau témoin/de dilution – Eau utilisée pour diluer la matière ou la substance d'essai et/ou pour le traitement témoin.

Eaux usées – Terme général englobant les effluents, les lixiviats et les éluviats.

Effluent – Tout déchet liquide (p. ex., industriel ou urbain) rejeté dans le milieu aquatique.

Éluviat – Solution aqueuse obtenue après addition d'eau à une matière solide (p. ex., sédiments, stériles, boues de forage, matières draguées), par brassage du mélange, par centrifugation et filtration de celui-ci ou par décantation du surnageant.

Essai toxicologique de référence – Essai effectué à l'aide d'un *toxique de référence* parallèlement à un essai toxicologique définitif sur une matière ou une substance d'essai donnée afin de mesurer la sensibilité des organismes et la *précision* ainsi que la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire pour ce toxique au moment de l'évaluation de la matière ou de la substance d'essai. Toute déviation par rapport à une plage normale préétablie indique que la sensibilité des organismes d'essai ainsi que le rendement et la précision de l'essai sont suspects.

Lixiviat – Eau, usée ou non, ayant traversé une colonne de sol ou de déchets solides dans l'environnement.

Matière – *Substance* dont est faite une chose. Ses caractéristiques seraient plus ou moins uniformes. Un effluent, un lixiviat, un éluviat ou une eau de surface sont des matières. Habituellement, une matière renferme un nombre plus ou moins grand de substances.

Sédiment – Matière particulaire naturelle qui, après son transport dans l'eau, se dépose au fond de l'océan. Ce terme peut également désigner une matière préparée artificiellement à partir de matières particulières choisies (p. ex., sable d'une granularité donnée, bentonite) à des fins expérimentales.

Sédiment de référence – Échantillon d'un *sédiment* présumé non contaminé, prélevé sur le terrain et choisi pour ses propriétés (p. ex., taille du grain, compacité, teneur en matière organique totale) représentatives des conditions sédimentaires étroitement appariées à celles de l'échantillon ou des échantillons du sédiment d'essai, sauf pour ce qui est de la teneur en contaminants chimiques. Il provient souvent d'un site où l'influence d'une ou de plusieurs sources de contamination anthropique est inexistante ou minimale, mais dans les environs du ou des sites de prélèvement des échantillons du sédiment d'essai. Un ou plusieurs échantillons du sédiment de référence devraient

être inclus dans chaque série d'essais visant à évaluer la toxicité d'un ou de plusieurs *sédiments d'essai*. Dans certains cas, le sédiment de référence peut s'avérer *toxique* à cause de substances chimiques présentes naturellement dans l'environnement, comme le sulfure d'hydrogène ou l'ammoniac, ou à cause de la présence inattendue de contaminants d'origine anthropique atteignant des concentrations ayant des effets nocifs. Il conviendrait d'éviter d'utiliser un tel sédiment (toxique) comme sédiment de référence dans les futurs essais toxicologiques, à moins qu'il n'en soit tenu compte dans le plan d'expérience et que le ou les responsables de l'essai souhaitent comparer les résultats obtenus avec cette matière et ceux obtenus avec un ou des échantillons du sédiment d'essai.

Sédiment témoin – Sédiment non contaminé (*propre*), c'est-à-dire ne renfermant aucun contaminant susceptible d'influer sur la fécondation des œufs d'échinides. Dans le présent rapport, il s'agit d'un sédiment naturel prélevé dans un site non contaminé et qui renferme de l'eau de porosité dont on sait qu'elle peut donner un taux de fécondation des œufs acceptable. Le sédiment témoin ne doit renfermer aucune matière ou substance d'essai. Il peut servir de base pour l'interprétation des données tirées d'un essai de toxicité à l'aide du ou des sédiments d'essai.

SHS ou *saumure hypersaline* – Solution de sels de mer et d'eau dont la concentration est plus élevée que celle de l'eau de mer. On peut préparer une saumure hypersaline en congelant partiellement de l'eau de mer filtrée de grande qualité et en récupérant le liquide non gelé, en la congelant pour ensuite la décongeler partiellement, ou encore par évaporation en la chauffant lentement. On peut également la préparer en ajoutant des sels de mer du commerce ou des sels de qualité réactif à de l'eau douce ou à de l'eau distillée. La concentration de la saumure utilisée dans le présent essai devrait être de 90 ± 1 g/kg.

Solution mère – Solution aqueuse concentrée de la substance ou de la matière d'essai. On ajoute des quantités mesurées d'une solution mère à l'*eau de dilution* pour préparer les concentrations voulues de la solution d'essai.

Substance – *Matière* particulière ayant des propriétés plus ou moins uniformes. Le terme a un sens plus restreint que *matière* et pourrait désigner une substance chimique (p. ex., un élément) ou un produit chimique donnés.

Substance chimique – Tout élément, composé, préparation ou mélange d'une substance chimique qui pourrait pénétrer dans l'environnement aquatique par déversement, épandage ou rejet. Les insecticides, herbicides et fongicides, les larvicides employés contre la lamproie marine et les agents de traitement des déversements d'hydrocarbures sont des exemples de substances chimiques faisant l'objet d'épandages dans l'environnement.

Témoin – Dans une enquête ou une étude, *traitement* reproduisant toutes les conditions et tous les facteurs qui pourraient influencer sur les résultats, sauf la condition particulière étudiée. Dans un essai toxicologique, le témoin doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, mais il ne doit pas renfermer de matière ou de substance d'essai contaminée. Le traitement sert à vérifier l'absence de toxicité mesurable attribuable aux conditions de base de l'essai (p. ex., la qualité de l'eau de dilution, la santé des organismes d'essai ou les effets dus à la manipulation de ces derniers).

Toxique de référence – Étalon chimique permettant d'établir la fiabilité des données sur la toxicité d'une matière ou d'une substance d'essai. Dans la plupart des cas, on procède à un essai toxicologique au

moyen d'un toxique de référence afin de mesurer la sensibilité des organismes au moment de l'évaluation de la matière ou de la substance d'essai ainsi que la *précision* des résultats obtenus par le laboratoire à l'égard de cette substance.

Termes relatifs aux statistiques et à la toxicologie

Aigu – Qui se manifeste à l'intérieur d'une période d'exposition relativement courte par rapport à la durée de la vie de l'organisme d'essai. Il s'agirait d'un intervalle de quelques jours dans le cas des échinides, qui vivent généralement plusieurs années; par exemple, les oursins globuleux vivent 4-8 ans. Un effet *toxique* aigu serait provoqué et observable au cours de cette période.

Carte de contrôle – Graphique servant à suivre l'évolution des effets mesurés d'un 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.

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

CI_p ou *concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)* – Estimation ponctuelle de la concentration d'une substance ou d'une matière d'essai qui provoque un pourcentage donné d'atteinte à une fonction biologique *quantitative*, comme le taux de croissance ou le nombre de jeunes par portée, par rapport au témoin. Par exemple, une CI_{25} pourrait être la concentration estimative à laquelle le taux de croissance sera inférieur de 25 % à celui du témoin. Ce terme devait être employé pour tout essai toxicologique visant à mesurer un effet quantitatif ou une modification du taux de croissance, de la fréquence respiratoire ou du taux de reproduction, par exemple. Dans le présent essai avec des échinides, le pourcentage d'inhibition de la fécondation permet d'évaluer globalement les effets non mesurés sur le sperme, les œufs et la fécondation. La *concentration efficace* correspondant à un pourcentage d'effet précisé (CE_p), comme la CE_{50} ou la CE_{25} , ne convient pas à ce type d'essai du fait qu'elle est limitée aux mesures *quantiques*, comme le fait d'estimer que cette concentration aurait un effet donné sur 25 % des organismes exposés. L'essai sur la fécondation chez les échinides n'est pas entièrement conforme aux exigences en matière de CE_p (comme la CE_{50}), car le nombre d'observations quantiques est élevé (≥ 100). Comme tel, le changement que provoquerait dans le pourcentage d'effet un spécimen qui réagit serait suffisamment faible pour que les données puissent être traitées comme si elles présentaient une distribution continue. Environnement Canada (EC, 2005) recommande donc d'estimer la CI_p , un paramètre quantitatif, pour l'essai sur la fécondation chez les échinides.

CMEO ou *concentration minimale avec effet observé* – Concentration la plus faible d'une matière ou d'une substance d'essai à laquelle des organismes sont exposés, qui provoque chez ces organismes des effets nocifs observables et statistiquement significatifs. Il pourrait s'agir, par exemple, de la concentration minimale à laquelle le succès de la fécondation des organismes exposés présente un écart significatif par comparaison avec le témoin.

CSEO ou *concentration sans effet observé* – Concentration la plus élevée d'une matière ou d'une substance à laquelle les organismes sont exposés et qui ne cause aucun effet nocif observable et statistiquement significatif. Il pourrait s'agir, par exemple, de la concentration la plus élevée à laquelle une variable observée, comme le succès de la fécondation, ne présente pas d'écart significatif par comparaison avec le témoin. La CSEO est habituellement corrélée avec des effets sublétaux et avec l'effet le plus sensible, à moins d'indication contraire.

CV ou *coefficient de variation* – Écart type (ET) d'un ensemble de données divisé par la moyenne de l'ensemble de données, exprimé sous forme de *pourcentage*. Il est calculé selon la formule suivante :

$$CV (\%) = 100 \times (ET \div \text{moyenne}).$$

Essai sans renouvellement des solutions – Essai toxicologique au cours duquel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées pendant la durée de l'essai. Dans la présente méthode, on emploie parfois l'expression « en conditions statiques » pour désigner ce type d'essai.

Essai toxicologique ou *essai de toxicité* – Détermination de l'effet d'une substance ou d'une matière sur un groupe choisi d'organismes, de tissus ou de cellules ou encore sur une autre matière vivante, dans des conditions définies. Un essai toxicologique en milieu aquatique permet habituellement de mesurer : a) la proportion des organismes atteints (mesure *quantitative*) ou b) l'intensité de l'effet observé (*quantitatif* ou gradué), après exposition à des concentrations données d'une substance chimique, d'un effluent, d'une eau réceptrice, d'un lixiviat, d'un éluviat ou d'une eau de porosité extraite d'un sédiment ou d'une matière solide semblable.

Homoscédasticité – Dans le présent document, se dit de données dont le diagramme de dispersion se caractérise par une homogénéité des résidus. Ce terme s'applique lorsque la variance des résidus n'est pratiquement pas différente de celle de la variable indépendante (c.-à-d. les concentrations d'essai ou de traitement). Lorsqu'on effectue des analyses statistiques et qu'on évalue les résidus (p. ex., à l'aide du test de Levene), dans le cas de données d'essai affichant une homoscédasticité (c.-à-d. une homogénéité des résidus), on n'observe aucune différence importante dans la variance des résidus pour toutes les concentrations d'essai ou de traitement.

Hormèse – Phénomène par lequel de faibles concentrations de la matière ou de la substance d'essai stimulent le rendement des organismes d'essai, par comparaison avec les organismes témoins (autrement dit, il y a amélioration du rendement à une ou plusieurs faibles concentrations par comparaison avec le traitement témoin). À des concentrations plus élevées, on observe des effets néfastes.

Identification et évaluation de la toxicité – Prétraitement systématique d'un échantillon (p. ex., ajustement du *pH*, filtration, aération), suivi d'essais toxicologiques. Cette évaluation permet de déterminer quel agent d'un mélange complexe est le principal responsable de la toxicité. L'essai toxicologique peut être létal ou sublétal.

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.

Limite de la zone de confiance – Limite, calculée logarithmiquement, située à plus ou moins deux écarts types (± 2 ET), de part et d'autre de la *moyenne géométrique* historique des paramètres de mesure d'essais toxicologiques effectués avec un toxique de référence.

Moyenne géométrique – Moyenne de mesures répétées, calculée logarithmiquement. Elle a pour avantage d'atténuer l'influence qu'exercent les valeurs extrêmes sur la moyenne, comme lorsqu'une moyenne arithmétique est établie. On peut calculer la moyenne géométrique comme étant la racine *énième* du produit de « n » valeurs et, aussi, comme l'antilogarithme de la moyenne des logarithmes des « n » valeurs.

Normalité (ou *distribution normale*) – Désigne une série de données d'observation qui, une fois reportées sur un graphique, décrivent une courbe symétrique en forme de cloche. Cette série met en

lien la fréquence d'occurrence et la valeur du phénomène mesuré. Dans une *distribution normale*, la plupart des données d'observation se regroupent près de la valeur moyenne et deviennent progressivement moins nombreuses à mesure qu'on se rapproche des extrêmes de la gamme de valeurs. La distribution normale joue un rôle central dans la théorie statistique en raison de ses propriétés mathématiques. Elle revêt également une grande importance dans les sciences biologiques du fait que beaucoup de phénomènes biologiques suivent la même courbe. Dans bon nombre de tests statistiques, on présume que les données suivent une courbe de distribution normale, de sorte qu'il pourrait être nécessaire de déterminer si c'est le cas d'un ensemble de données en particulier.

Paramètre – Mesure ou valeur (il peut y en avoir plus d'une) caractérisant les résultats de l'essai (p. ex., CI_{25}). La réaction des organismes d'essai (p. ex., la fécondation) constitue également un paramètre.

Précision – Degré de rapprochement des données recueillies au cours de mesures répétées de la même quantité. 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 .

Quantique – Adjectif utilisé dans des expressions comme données quantiques et essai quantique. Un effet quantique est un effet auquel chaque organisme d'essai réagit ou ne réagit pas. Par exemple, un animal peut soit vivre, soit mourir, ou encore un œuf peut être fécondé ou non. En général, l'effet quantique est exprimé sous forme de nombre ou de pourcentage. Les estimations *quantitatives* s'effectuent à partir de données quantiques si le nombre d'observations quantiques est élevé (100-200 œufs par récipient) (EC, 2005).

Quantitatif – Adjectif utilisé dans des expressions comme données quantitatives et essai quantitatif. Un effet quantitatif est un effet dont la valeur mesurée peut être un nombre entier ou une fraction de celui-ci sur une échelle numérique. Il peut s'agir, par exemple, de la masse de chaque organisme ou encore du nombre de descendants produits à la fin de l'essai.

Répétition (traitement de, récipients d'essai de) – Enceinte expérimentale individuelle renfermant un nombre prescrit d'organismes exposés à une concentration de la matière ou de la substance d'essai, ou encore à un ou des traitements témoins ou traitements de référence. Comme il s'agit d'une unité expérimentale indépendante, tout transfert d'organismes, de substance ou de matière d'essai d'une enceinte à une autre invaliderait l'analyse statistique fondée sur la répétition.

Subléta – Qui a un effet néfaste sur l'organisme, mais en deçà de la concentration ou du niveau de contamination causant directement la mort au cours de l'essai.

Toxicité – Capacité propre d'une substance ou d'une matière de provoquer des effets nocifs chez des organismes vivants. Ces effets pourraient être *létaux* ou *sublétaux*.

Toxicité chronique – Effets à long terme liés à des changements de métabolisme, de croissance, de reproduction et d'aptitude à la survie, notamment.

Toxicologie – Science qui étudie la toxicité des substances, des matières ou des conditions d'un milieu. Cette science fait appel à une gamme illimitée de disciplines scientifiques, d'outils de laboratoire ou de terrain, d'études à divers niveaux d'organisation allant de la molécule à une espèce individuelle, à des populations ou à des communautés. La toxicologie appliquée se propose normalement de définir la marge de sécurité de l'emploi d'une ou de plusieurs substances ou matières.

Toxique – Synonyme de substance ou de matière toxique. Un toxique peut avoir des effets nocifs sur des organismes s'il se trouve en quantité suffisante à un endroit donné.

Traitement – En règle générale, intervention ou procédure dont l'effet doit être mesuré. Plus précisément, dans un essai toxicologique, un traitement est une condition ou une procédure que le responsable de l'essai applique aux organismes d'essai afin de mesurer l'effet ou les effets d'une substance ou d'une matière sur ces organismes. Le traitement peut consister en une concentration donnée d'une matière ou d'une substance potentiellement *toxique*. Il peut aussi s'agir d'une matière d'essai en particulier (p. ex., un échantillon d'effluent, d'élutriat, de lixiviat, d'eau réceptrice ou d'eau témoin).

Remerciements

La première édition de la présente méthode d'essai biologique, publiée en décembre 1992 et modifiée en novembre 1997, a été rédigée en collaboration par John B. Sprague [Sprague Associates Ltd., Guelph Ont.)] et Donald J. McLeay [McLeay Associates Ltd., West Vancouver (C.-B.)]. Elle s'inspirait des méthodes de nombreux auteurs, laboratoires, organismes et autres groupes d'Europe, du Japon, des États-Unis et du Canada, de même que d'une recension d'articles de référence pertinents (Sprague et McLeay, 1991). Gary A. Sergy et Richard P. Scroggins (Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada), en leur qualité d'autorité scientifique, ont apporté une aide technique et orienté les travaux pendant l'établissement de la première édition du rapport SPE 1/RM/27.

Les membres du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (GIEE; v. annexe B) ont participé activement à l'élaboration et à l'examen de la première édition du document et méritent tous nos remerciements. Nous tenons à souligner en particulier l'apport technique des membres du sous-comité du GIEE qui a assumé la responsabilité de la première et de la dernière révisions de la première édition du présent rapport : Gary A. Chapman [USEPA, Newport (OR)]; Paul A. Dinnel [University of Washington, Seattle (WA)]; Timothy J. Hall [NCASI, Anacortes (WA)]; John H. Himmelman [Université Laval (Qué.)]; Emilia Jonczyk [Beak Consultants Ltd., Brampton (Ont.)]; Cathy A. McPherson [EVS Consultants, North Vancouver (C.-B.)]; et les membres du GIEE : Kenneth G. Doe, Richard P. Scroggins, Gary A. Sergy, Graham C. van Aggelen, Peter G. Wells et Stewart G. Yee. Nous tenons également à remercier les laboratoires d'Environnement Canada (Atlantique : K.G. Doe; Pacifique et Yukon : S.G. Yee), Beak Consultants Ltd. (Jennifer Miller, E. Jonczyk) et EVS Consultants (C.A. McPherson), qui ont fourni des conseils précieux pour les essais menés en laboratoire aux fins de la première édition de la méthode.

Les personnes suivantes, qui ont passé en revue des versions préliminaires ou la version définitive de la première édition, ont offert des renseignements et formulé de nombreux commentaires qui nous ont été fort utiles : Brian S. Anderson [University of California, Santa Cruz (CA)]; Glenn F. Atkinson [Division des statistiques appliquées, Environnement Canada, Ottawa (Ont.)]; Robert S. Carr [Fish and Wildlife Service des États-Unis, Corpus Christi (TX)]; Guy L. Gilron [Sentar, Surrey (C.-B.)]; Larry R. Goodman [USEPA, Gulf Breeze (FL)]; Christopher W. Hickey (Water Quality Centre, Hamilton, Nouvelle-Zélande.); Harold H. Lee [University of Toledo, Toledo (OH)]; Richard Lloyd (Chelmsford, Essex, Royaume-Uni); Marian L. Nipper (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo, Brésil); James M. Osborne [Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (Ont.)]; Jerry F. Payne [Pêches et Océans Canada, St. John's (T.-N.-L.)]; Linda Porebski [Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (Ont.)].

Les photographies de la page couverture de la première édition ont été fournies par Stewart Yee, Laboratoire de toxicité aquatique, région du Pacifique et du Yukon, Environnement Canada.

La présente édition (la deuxième) a été préparée par Jennifer Miller [Miller Environmental Sciences Inc., King City (Ont.)], avec l'aide et les conseils de Lisa Taylor (gestionnaire, Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes) et de Richard P. Scroggins [chef, Section des méthodes biologiques, Environnement Canada, Ottawa (Ont.)]. Nous remercions sincèrement Barry Zajdlik [Zajdlik & Associates, Rockwood (Ont)] pour ses conseils en matière de statistique en lien avec les analyses de régression. Cette deuxième édition intègre les modifications apportées en novembre 1997 (et adaptées au besoin) et comporte de nombreuses mises à jour, comme des lignes directrices révisées sur l'ajustement de la *salinité*, une méthode révisée pour les essais sur de l'eau de porosité et l'utilisation

d'analyses de régression pour les données sur les paramètres *quantitatifs*. Les avis et suggestions reçus en réponse à un questionnaire envoyé à des laboratoires du Canada et des États-Unis effectuant des essais de toxicité sublétales, sont à l'origine de nombreux changements apportés à la première édition et ont été pris en compte dans l'établissement de la deuxième édition du rapport SPE 1/RM/27.

Les membres suivants du personnel des laboratoires ayant répondu à notre questionnaire nous ont fait parvenir de nombreuses observations et suggestions utiles, et nous les en remercions : Ken Doe et Paula Jackman [Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique, Environnement Canada, Moncton (N.-B.)]; Emila Jonczyk et Keith Holtze [AquaTox Testing and Consulting Inc., Guelph (Ont.)]; Janet Pickard [Cantest Ltd., Burnaby (C.-B.)]; Scott Carr, Marion Nipper et Jim Biedenbach [Columbia Environmental Research Centre, TAMU-CC, Centre for Coastal Studies, Corpus Christi (TX)]; Cathy McPherson [Golder Associates Ltd., North Vancouver (C.-B.)]; Armando Tank [Nautilus Environmental, Burnaby (C.-B.)]; Suzanne Agius [Programme d'immersion en mer, Environnement Canada, Hull (Qué.)]; Craig Buday [Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon, North Vancouver (C.-B.)]; Steve Bay et Darrin Greenstein [Southern California Coastal Water Research Project, Costa Mesa (CA)]. Nous exprimons notre gratitude à Don McLeay [McLeay Environmental Ltd., Victoria (C.-B.)], pour son aide dans la prise en compte des nombreux commentaires reçus en réponse à notre questionnaire et dans la révision de la deuxième édition du présent document.

Les modifications apportées à la méthode d'essai sur sédiment sont fondées principalement sur les résultats d'une étude interlaboratoire effectuée en 2008 en vue d'examiner les améliorations à apporter à la section du rapport SPE 1/RM/27 relative aux essais sur l'eau de porosité. Les personnes suivantes ont participé à cette étude, et nous les remercions pour leurs avis et suggestions : Ken Doe et Paula Jackman [Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique, Environnement Canada, Moncton (N.-B.)]; Craig Buday [Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon, North Vancouver (C.-B.)]; Scott Carr et Jim Biedenbach [Columbia Environmental Research Centre, TAMU-CC, Centre for Coastal Studies, Corpus Christi (TX)]. Nous remercions particulièrement Richard P. Scroggins et Lisa Taylor [Section des méthodes biologiques, Environnement Canada, Ottawa (Ont.)] qui, en tant qu'autorité scientifique, ont apporté une aide technique et orienté les travaux.

Introduction

1.1 Contexte

Au Canada et ailleurs dans le monde, les *essais toxicologiques* en milieu aquatique servent à mesurer, à prévoir et à réglementer le rejet de *substances* ou de *matières* qui *pourraient* être nocives pour les organismes aquatiques en milieu naturel. Il y a deux décennies, reconnaissant qu'une seule méthode d'essai ou un seul organisme d'essai ne pouvait répondre aux besoins d'une démarche globale en matière de conservation et de protection de l'environnement, le Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (v. annexe B) a proposé de mettre au point et de normaliser une batterie d'essais de toxicité monospécifiques en milieu aquatique, qui seraient généralement acceptables et qui permettraient de mesurer différents types d'effets *toxiques* chez des organismes représentatifs de différents niveaux trophiques et groupes taxinomiques (Sergy, 1987). Un essai portant sur le succès de la fécondation à l'aide de *gamètes* d'oursins globuleux ou d'oursins plats a ensuite été choisi parmi les essais toxicologiques en milieu aquatique afin de satisfaire aux exigences d'Environnement Canada en matière d'essais.

Environnement Canada a publié la première édition de la présente méthode d'essai biologique en décembre 1992, le Rapport SPE 1/RM/27 (EC, 1992c), et l'a modifiée en novembre 1997. Après 15 ans d'application dans les laboratoires d'essai des secteurs public et privé, Environnement Canada a reconnu qu'il fallait modifier des aspects précis de la méthode. La révision a commencé par l'établissement d'un questionnaire et sa distribution aux laboratoires d'essais *toxicologiques* du Canada et des États-Unis ayant déjà mené des essais sur la fécondation chez les échinides. Le questionnaire avait pour but de recueillir des détails sur les espèces d'échinide utilisées pour les essais et sur les conditions de

maintien et d'acclimatation des organismes, de même que sur les techniques de provocation du frai et de fécondation utilisées par les divers laboratoires utilisant la méthode biologique. Le cas échéant, les indications des laboratoires ayant répondu au questionnaire ont été intégrées dans la présente méthode. Les révisions apportées aux procédures d'essai sur sédiment (*eau de porosité*) sont principalement fondées sur les résultats d'une étude interlaboratoire sur l'amélioration (plus grande sensibilité de l'essai et réduction de l'influence des facteurs confusionnels sur les résultats) de la composante de l'essai sur l'eau de porosité (Miller, 2008).

La présente édition (la deuxième) comporte de nombreuses améliorations procédurales, des mises à jour et des conseils plus explicites, de même que des instructions sur les méthodes statistiques révisées (analyses de régression) à utiliser pour le calcul des effets sur la fécondation (inhibition), qui constituent un *paramètre* d'essai.

Le présent rapport décrit les méthodes universelles applicables à un essai sur la fécondation au moyen de *gamètes* d'échinides. Il décrit également des ensembles particuliers de conditions et de modes opératoires prescrits ou recommandés pour l'essai visant à évaluer différents types de substances ou de matières [p. ex., des échantillons de *substance chimique*, d'*effluent*, d'*eau réceptrice*, de *lixiviat*, d'*élutriat* ou d'*eau interstitielle* (*eau de porosité*) provenant d'un *sédiment* ou d'une autre matière solide semblable; v. figure 1]. Les méthodes et conditions applicables à la conduite de l'essai sont définies et, au besoin, expliquées dans des notes en bas de page.

En décrivant les conditions expérimentales et les méthodes figurant dans le présent document, on s'est efforcé de trouver le juste milieu entre les

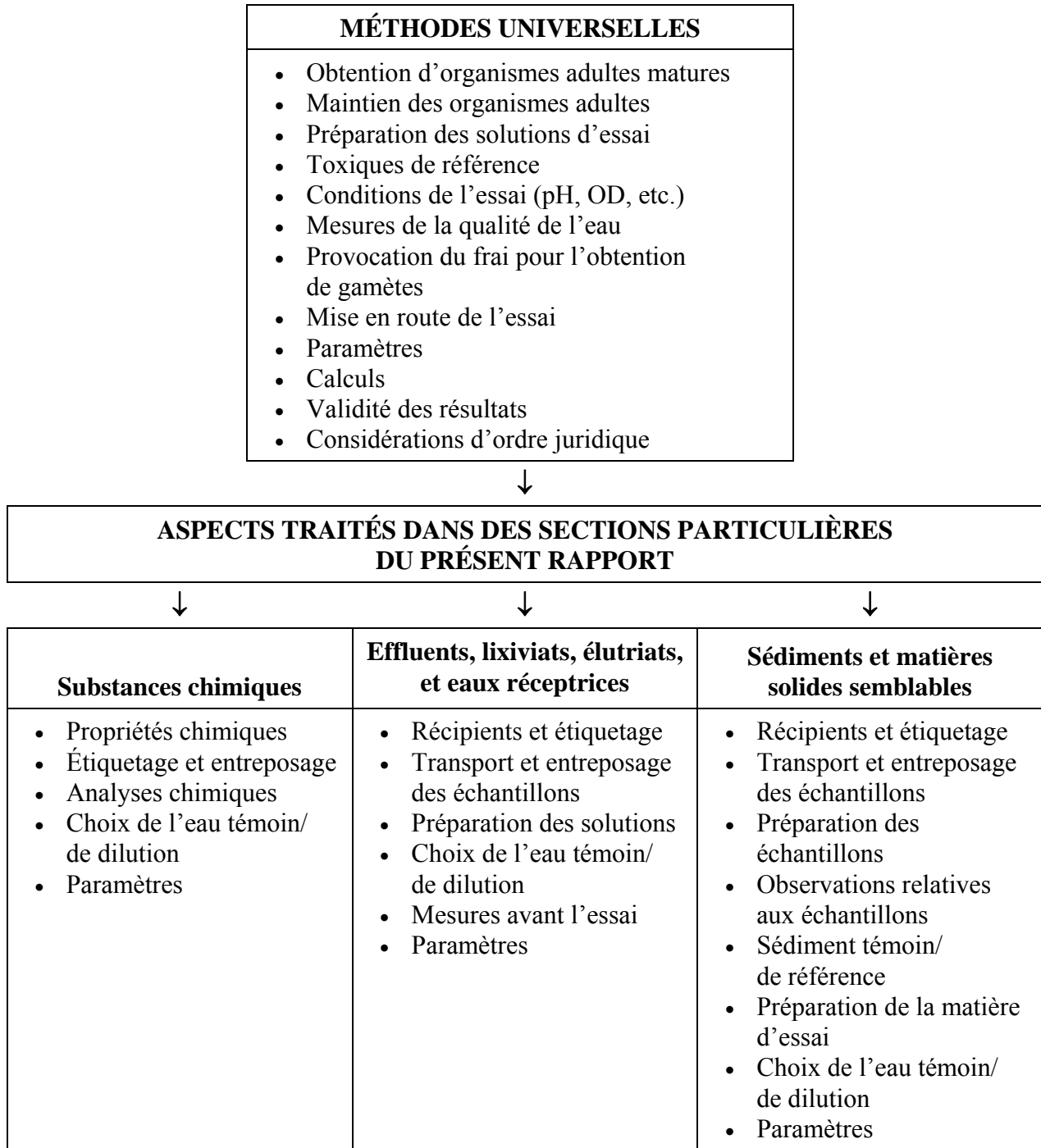


Figure 1. Éléments à prendre en compte dans la détermination des conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de matières ou de substances

coûts et les considérations scientifiques et pratiques, tout en s'assurant que les résultats seront assez exacts et précis pour la plupart des situations auxquelles ils pourraient s'appliquer. Les auteurs supposent que l'utilisateur connaît dans une certaine mesure les essais de toxicité en milieu aquatique. Le présent document renferme des indications pour un certain nombre d'applications et d'options d'essais. Il ne renferme pas d'instructions explicites qui *pourraient* être exigées dans un *protocole réglementaire* ou une *méthode de référence*, bien qu'il soit conçu comme un guide utile pour des applications de ce type, notamment.

Pour obtenir des conseils sur la mise en œuvre de la présente méthode et d'autres essais biologiques et sur l'interprétation et l'application des données sur les paramètres, prière de consulter le rapport SPE 1/RM/34 (EC, 1999).

1.2 Caractéristiques générales et utilisation des échinides dans des essais

Les oursins globuleux et les oursins plats appartiennent à l'embranchement des échinodermes, sous-embranchement des échinozoaires et classe des échinidés, et c'est pourquoi on peut les désigner collectivement sous le nom d'« échinides ». Parmi les autres membres de cet embranchement (qui ne sont cependant pas utilisés pour cet essai), on compte les étoiles de mer, les ophiures, les fausses étoiles de mer, les holothuries, les crinoïdes ou lis de mer et les comatules. On trouve partout dans le monde des représentants de cet embranchement, qui compte ~6 000 espèces vivantes connues. Sept espèces d'oursin globuleux et trois espèces d'oursin plat vivent dans les *eaux marines* côtières du Canada.

On considère que les échinides et les autres représentants du même embranchement sont des invertébrés évolués et complexes sur le plan structural. Ils possèdent de nombreuses caractéristiques élaborées et beaucoup de points

communs avec les cordés, notamment pour ce qui est du mode de développement embryonnaire et de certains processus biochimiques. Ils présentent une structure radiale apparente — leur corps est composé de cinq parties disposées autour d'un axe central — qui cache une symétrie bilatérale primaire. Les échinides possèdent un squelette interne véritable recouvert d'un mince épiderme. L'endosquelette est constitué de petites plaques calcaires unies les unes aux autres; chez l'oursin globuleux et l'oursin plat, ces plaques sont fusionnées et forment une enveloppe solide appelée « *test* ». Les échinides et les autres représentants de l'embranchement sont pourvus d'un cœlome (cavité corporelle) bien développé, dont la plus grande partie entoure les organes internes (figure 2). Le *système aquifère* (« hydraulique »), constitué de canaux en forme de tubes qui parcourent tout le corps, constitue une autre partie du cœlome; ce système sert au mouvement des tubes ambulacraires associés à la locomotion et à d'autres fonctions.

Les oursins globuleux sont de forme sphérique et recouverts d'épines, tandis que les oursins plats sont aplatis suivant l'axe dorso-ventral et ont généralement la forme d'un disque (figure 2). Ils reposent sur leur face ventrale (orale). La bouche de l'oursin globuleux est entourée d'une *membrane péristomiale*. Au cours de l'essai décrit ici, on doit injecter une solution chimique à travers cette membrane dans le cœlome. Chez l'oursin plat, on doit faire l'injection dans la bouche. L'anus de l'oursin globuleux est situé sur la face aborale (dirigée vers le haut), mais chez l'oursin plat, il est situé sur la même face que la bouche.

Les sexes sont séparés, mais aucune caractéristique externe ne les distingue. Les grosses gonades internes (v. figure 2) s'ouvrent, sur la face aborale, par 5 pores génitaux chez l'oursin globuleux et 4 chez l'oursin plat. Un des pores de l'oursin globuleux est situé sur la *plaque madréporique*, une large plaque visible du test où aboutit le système aquifère de l'animal.

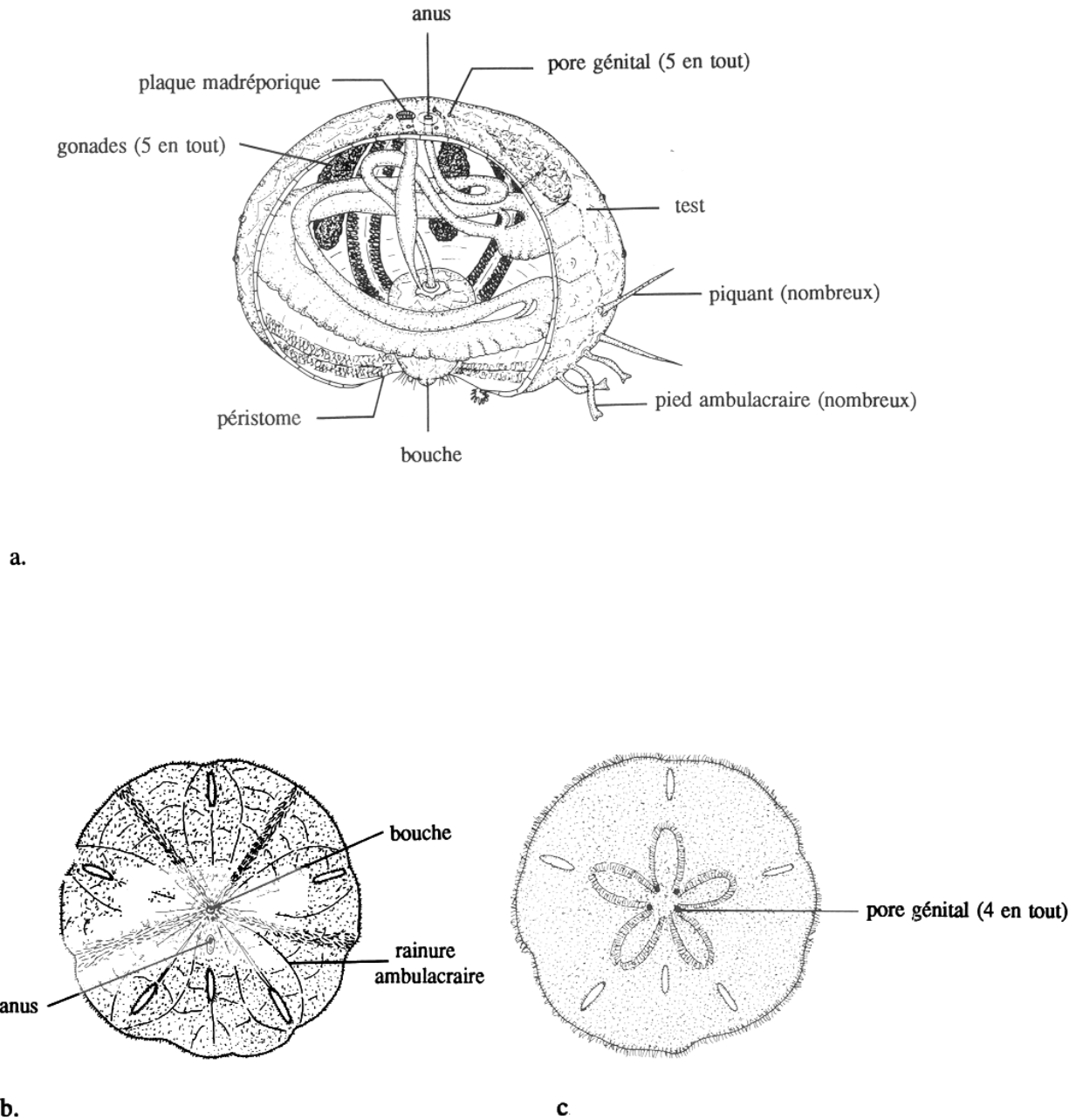


Figure 2. Aspect général des échinides

a. Vue en coupe d'un oursin globuleux type (*Arbacia* sp.), montrant les pores génitaux situés sur la face aborale. On n'a représenté que 2-3 piquants et pieds ambulacraires, qui sont très nombreux. **b.** Face orale (généralement dirigée vers le bas) d'un oursin plat type. **c.** Face aborale d'un oursin plat montrant les pores génitaux. [Dessins de M.A. White, d'après Storer et coll. (1979) et Barnes (1974).]

Les *gamètes* (spermatozoïdes et œufs) sont rejetés à travers les pores génitaux dans la mer, où la fécondation a lieu.

Le développement de l'oursin globuleux, depuis l'œuf jusqu'au dernier stade larvaire (celui des « pluteus »), est d'un grand intérêt sur le plan embryologique : en 1980, plus de 5 000 articles avaient été publiés sur le sujet (NRC, 1981). C'est ce qui explique que, depuis de nombreuses décennies, on utilise des larves d'oursin globuleux dans les essais toxicologiques (Lillie, 1921; Drzewina et Bohn, 1926; Bougis, 1959). Une étude particulièrement élaborée a été réalisée au début du XX^e siècle sur les effets de la *toxicité* des métaux sur la fécondation chez l'oursin globuleux (Hoadley, 1923). L'oursin globuleux et l'oursin plat sont maintenant utilisés couramment comme organismes types dans les essais toxicologiques (Dinnel et coll., 1987, 1988) et un large bassin de données toxicologiques s'est constitué (Kobayashi, 1984).

L'essai sur la fécondation chez les échinides est sensible. Ainsi, des effluents municipaux ont eu un effet très marqué sur la fécondation des œufs à des teneurs 10 fois moins élevées que celles ayant causé la mort de 50 % des têtes-de-boule lors d'un essai de 4 jours (Oshida et coll., 1981). Des 6 essais de toxicité *sublétale* (eau de mer et eau douce) réalisés dans le cadre d'une étude interlaboratoire sur la toxicité d'effluents en Californie, l'essai sur la fécondation chez les échinides se classait aux deuxième et troisième rangs pour ce qui est de la sensibilité (Anderson et coll., 1991). L'essai de 80 min était plus sensible aux effluents provenant d'une station municipale d'épuration des eaux usées que les essais de 48 h avec des embryons et des larves d'huître et de crabe (Dinnel et Stober, 1987). On a obtenu des résultats variables quant à la toxicité comparée de métaux et de composés organiques, selon qu'il s'agissait d'un essai sur la fécondation, d'un essai de luminescence bactérienne ou d'un essai de létalité *aiguë* avec des poissons et des crustacés. Les essais avec des échinides pouvaient être 10, 100 ou

1 000 fois plus sensibles que les autres et, dans certains cas, 10 fois moins sensibles (Nacci et coll., 1986). Les résultats des essais sur la fécondation chez les échinides indiquent que ces essais étaient aussi sensibles que ceux avec des embryons et des larves de crabe, de calmar et de poisson; comparativement aux essais de létalité aiguë avec des poissons de mer, ils étaient assez sensibles aux métaux, mais beaucoup moins aux pesticides (Dinnel et coll., 1989). Dans le cas d'effluents de fabriques de pâtes et papiers, le National Council of the Paper Industry for Air and Stream Improvement (NCASI, 1992) mentionne les résultats de travaux de Johnson et coll. (1990), qui indiquent que les essais avec des embryons et des larves d'huître étaient ~10 fois plus sensibles que les essais sur la fécondation chez les échinides. Par contre, ces derniers essais étaient au moins aussi sensibles que les essais sur la reproduction d'algues rouges et, souvent, jusqu'à 10 fois plus sensibles que les autres essais de toxicité *sublétale* en milieu marin sur la croissance et le développement de larves de poisson (capucette et méné tête-de-mouton) ou de mysis (crevette) juvénile (Schimmel et coll., 1989).

L'essai sur la fécondation est un essai sensible de toxicité *sublétale*. Les gamètes d'échinides correspondent à un des stades les plus vulnérables du développement, sinon au stade le plus vulnérable du cycle biologique, d'où leur grande sensibilité à différents *toxiques* (Kobayashi, 1980, 1984). Cependant, comme la durée de l'essai est très courte par rapport à la durée de vie des espèces (quelques années), il ne constitue pas un essai de toxicité *chronique*. L'essai sur la fécondation décrit dans le présent document ne remplace pas les essais de *toxicité chronique* avec des échinides, car il ne permet peut-être pas d'estimer les effets d'expositions de longue durée. On prévoit toutefois qu'il peut donner des résultats qui s'approchent davantage de ceux des essais de toxicité chronique que ne le ferait un essai de toxicité létale classique avec une espèce marine ou dulcicole (p. ex., EC, 1990a, 1990b, 1990c).

La *précision* de cet essai semble satisfaisante. Selon l'U.S. Environmental Protection Agency (USEPA, 2002), les *coefficients de variation* (CV) intralaboratoire des CI_{50} et des CI_{25} des *toxiques de référence* utilisés lors d'essais avec une espèce d'échinide (*Arbacia punctulata*) étaient de 23-48 % et de 29-55 %, respectivement. En comparant les CI_{50} du cuivre obtenues par 6 laboratoires lors d'essais sur 4 espèces d'échinide, menés dans le cadre d'un programme d'évaluation de la toxicité d'effluents, on obtenait un CV de 74 %, contre un CV de 29-38 % pour des essais de toxicité sublétales avec une seule espèce (reproduction de *Ceriodaphnia* et premiers stades de têtes-de-boule et d'huîtres; Anderson et Norberg-King, 1991). En comparant les CI_{25} du cuivre au cours de 5 essais monospécifiques effectués par différents laboratoires canadiens, on a obtenu des CV de 62 %, 65 %, 75 %, 82 % et 110 % (oursins globuleux de 3 espèces exposés pendant 20 min). Les CV des CI_{50} des mêmes essais étaient plus faibles, soit 23 %, 48 %, 57 %, 80 % et 94 % (Miller et coll., 1992). Ces CV interlaboratoire, dont la moyenne était de 79 % pour les CI_{25} et de 63 % pour les CI_{50} , ont une précision comparable à celle des analyses chimiques, dont le CV moyen se situait entre 30 % et 60 % par suite d'une comparaison interlaboratoire des résultats d'analyses chimiques de polluants d'intérêt prioritaire (Rue et coll., 1988; Gosset et coll., 2003). Les résultats inédits d'essais comparatifs interlaboratoire commandités par l'USEPA semblent corroborer ces résultats : CV de 57 % pour les essais sur la fécondation de 40 min et CV de 86 % pour les essais de 80 min (NCASI, 1992).

Au Canada, avant 1992, l'essai sur la fécondation chez les échinides a été utilisé dans plusieurs laboratoires gouvernementaux et industriels effectuant des essais de toxicité en milieu aquatique. Des méthodes d'essai normalisées ont été décrites en Colombie-Britannique (MECB, 1990; van Aggelen, 1988) ainsi que par des sociétés d'experts-conseils (Beak, 1988; EVS, 1989). À l'échelle nationale, un groupe fédéral-provincial (GITA, 1991) a

commandité une étude sur des méthodes d'essai, menée par certains laboratoires d'Environnement Canada (v. annexe C). D'autres études interlaboratoire ont été réalisées l'année suivante par des laboratoires fédéraux, provinciaux (ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique) et privés (Miller et coll., 1992). Les essais avec des échinides ont été étudiés et recommandés par un scientifique d'Environnement Canada (Wells, 1982, 1984), mais aucun organisme fédéral canadien n'a publié de méthode normalisée avant 1992.

Depuis sa parution en 1992 (et sa modification en 1997), l'*Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)* d'Environnement Canada (SPE 1/RM/27) a été utilisé couramment dans deux importants programmes découlant de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE); il a aussi été employé dans le cadre de deux règlements d'application de la *Loi sur les pêches* du Canada. Aux termes du Programme d'immersion en mer, l'essai de toxicité sublétales de l'eau de porosité d'un sédiment sur la fécondation chez les échinides sert à déterminer si des déblais de dragage peuvent être immergés en mer (LCPE, 1999; Gouvernement du Canada, 2001). Aux termes du Programme de suivi des effets sur l'environnement, l'essai sur la fécondation chez les échinides permet d'évaluer la toxicité sublétales d'effluents de fabriques de pâtes et papiers et de mines de métaux, rejetés dans le milieu marin (MPO, 1992, 2002).

Aux États-Unis, plusieurs groupes ont proposé des méthodes d'essai de toxicité sublétales avec des échinides. L'USEPA a mis au point une méthode qui fait autorité en ce qui a trait aux essais avec les espèces d'échinide indigènes de la côte atlantique (USEPA, 1988, 1994, 2002) et de la côte pacifique (Chapman, 1991, 1992a; USEPA, 1995). L'American Society for Testing and Materials a aussi mis au point des essais sur la fécondation (ASTM, 1990), mais seul l'essai avec des *embryons* d'échinide a été publié (ASTM, 2002). De plus, le NCASI (1992) a fait une critique des méthodes récentes applicables surtout aux essais sur des effluents de fabriques

de pâtes et papiers. En outre, un certain nombre de sociétés d'experts-conseils et d'autres laboratoires de biologie marine ont mis par écrit leurs propres méthodes (v. annexe D).

De nombreux auteurs et groupes d'auteurs ont publié des articles présentant des méthodes normalisées. Parmi ceux-ci, on note les articles de Kobayashi, Dinnel et coll., et Pagano et coll. Certains de ces articles apparaissent dans les Références et de nombreux autres figurent dans la Bibliographie (v. annexe E).

De nombreuses raisons motivent l'utilisation d'un essai sur la fécondation chez les échinides comme méthode d'évaluation de la toxicité sublétales dans les milieux marins au Canada. En règle générale, l'essai est rapide, sensible et relativement simple. Il présente notamment les avantages suivants (NRC, 1981; Dinnel et Stober, 1985; Esposito et coll., 1986; Dinnel et coll., 1987) :

- la biologie et le cycle biologique des principales espèces sont bien documentés;
- ces organismes sont présents en grand nombre sur les trois côtes canadiennes;
- la récolte d'oursins globuleux et d'oursins plats adultes en eau peu profonde ne présente aucune difficulté;
- le maintien des organismes adultes en laboratoire est simple, et les conditions peuvent aisément être modifiées de façon à prolonger la période du frai;
- des gamètes de qualité et de sensibilité uniformes peuvent être obtenus;
- le succès de la fécondation est un indicateur sensible et fondamental de la sublétales;
- l'essai sur la fécondation est rapide et économique, car il est de peu d'envergure et facile à réaliser, et il ne nécessite que des installations et de l'équipement ordinaires;

- les œufs d'échinides sont déjà haploïdes au moment de leur libération, contrairement à ceux de la plupart des animaux, et c'est pourquoi il n'y a pas de délais;
- le paramètre de l'essai est relativement simple et objectif;
- on trouve des échinides partout dans le monde, et ils sont fréquemment utilisés comme espèces marines types à des fins de réglementation et de recherche. On peut facilement les expédier et les utiliser dans des laboratoires éloignés des océans.

En plus de servir aux études de la toxicité générale en milieu marin, l'essai sur la fécondation chez les échinides semble convenir à l'identification de constituants sublétales d'effluents complexes à l'aide de la méthode d'*identification et d'évaluation de la toxicité* (IET) décrite dans USEPA (1991a, 1991b).

Le présent rapport « générique » a pour objet de fournir des méthodes d'essai canadiennes normalisées pour l'évaluation de la *toxicité* sublétales de diverses substances ou matières sur les *gamètes* d'échinides. Il privilégie certaines options parmi celles que renferme un cadre normalisé, notamment le choix des espèces, la durée de l'exposition, le type d'essai (une seule concentration de la substance ou de la matière à l'étude, à résultat unique, ou plusieurs concentrations), les volumes d'essai et le type d'eau utilisée pour la dilution et les témoins. Les méthodes d'essai avec des échinides déjà publiées n'ont pas les mêmes paramètres et n'abordent pas de la même façon les questions telles que l'ajustement du *pH*, l'adaptation des modes opératoires aux objectifs, le choix de l'*eau témoin/de dilution* et le traitement des échantillons contenant une quantité appréciable de solides ou de matière flottante. Le rapport est censé servir à l'évaluation de la toxicité sublétales d'échantillons de substance chimique, d'effluent, de lixiviat, d'élutriat, d'eau réceptrice et de liquide provenant de sédiments et de matières solides semblables. On y justifie également les démarches choisies.

La méthode préconise l'utilisation d'animaux acclimatés à l'eau de mer, de même que l'emploi d'eau de mer comme eau de dilution et eau *témoin*. Selon les objectifs de l'essai, l'eau de mer peut être reconstituée ou naturelle, mais sa *salinité* devrait être voisine de celle de l'eau de mer naturelle. Pour évaluer la toxicité *létale*

et sublétale de substances chimiques ou d'*eaux usées* qui sont ou qui doivent être rejetées dans les milieux d'eau douce ou qui s'y trouvent déjà, il existe d'autres essais avec des poissons acclimatés à l'eau douce ou avec d'autres organismes dulcicoles sensibles (v. annexe A).

Organismes d'essai

2.1 Espèces

L'essai *doit* être mené avec une des espèces énumérées ci-dessous.

Strongylocentrotus droebachiensis (O.F. Müller) – L'**oursin vert** est une espèce circumpolaire présente sur les côtes atlantique et pacifique du Canada ainsi que dans l'océan Arctique, jusqu'au 80^e parallèle.

Strongylocentrotus purpuratus (Stimpson) – Cette espèce, appelée **oursin violet du Pacifique** dans le présent rapport (et communément appelé oursin violet), est présente sur la côte pacifique, du Canada jusqu'en Basse-Californie (Meinkoth, 1981).

Dendraster excentricus (Eschscholtz) – Cette espèce d'oursin plat est présente sur la côte pacifique, du Canada en allant vers le sud. Dans le présent rapport, on utilise son nom commun courant, soit **clypéastre excentrique** (Meinkoth, 1981).

Arbacia punctulata (Lamarck) – L'**oursin violet de l'Atlantique** (Mienkoth, 1981) est présent sur la côte atlantique des États-Unis, de Cape Cod jusqu'aux Caraïbes, de même que dans le golfe du Mexique.

Lytechinus pictus (Verrill) – L'**oursin blanc** est présent sur la côte de la Californie jusqu'à Panama.

Les 4 premières espèces énumérées ici peuvent être prélevées sur une ou plusieurs côtes canadiennes. On peut se procurer les 5 espèces auprès de fournisseurs de matériel biologique, qui se chargeront de les expédier au laboratoire.

Toutes les espèces énumérées ci-dessus figurent sur la liste des échinides couramment utilisés en laboratoire (NRC, 1981), et la plupart ont été employées à maintes reprises dans les essais de

toxicité (v. annexe D). D'après les renseignements reçus des laboratoires du Canada et des États-Unis en réponse au questionnaire distribué avant l'établissement de cette deuxième édition de la méthode (v. 1.1), l'oursin vert (*S. droebachiensis*) est, parmi les 5 espèces candidates incluses dans la première édition du rapport SPE 1/RM/27, celle qui a été le moins utilisée. Dans une perspective canadienne, il est cependant souhaitable d'utiliser l'oursin vert, étant donné qu'il s'agit de la seule des 5 espèces d'échinide mentionnées ci-dessus qui soit présente dans les océans Pacifique, Atlantique et Arctique. Des essais récents ont permis de confirmer que les œufs d'oursin vert sont relativement gros (3-4 fois plus gros que ceux des 4 autres espèces), possèdent des membranes de fécondation très visibles et affichent de bons taux de fécondation dans l'eau de mer non contaminée (Jackman, comm. pers., 2008). C'est pour ces raisons d'ordre géographique et biologique que l'oursin vert a été conservé comme espèce d'essai dans cette deuxième édition du rapport SPE 1/RM/27.

En général, les résultats des essais toxicologiques sur la fécondation chez les échinides semblent similaires, quelle que soit l'espèce étudiée (Kobayashi, 1984; Nacci et coll., 1986). On peut cependant observer de légers écarts sur le plan de la sensibilité, selon le toxique utilisé pour l'essai. Par exemple, le clypéastre excentrique semble ~1,4 fois plus sensible au dodécyl sulfate de sodium que l'oursin violet du Pacifique et 1,7 fois plus sensible aux effluents de fabriques de pâtes au sulfite blanchies que l'oursin vert (NCASI, 1992). Dans une étude plus récente portant sur 3 espèces d'oursin globuleux (oursin violet du Pacifique, oursin violet de l'Atlantique et oursin blanc) et 1 espèce d'oursin plat (clypéastre excentrique), on a constaté que l'oursin blanc et le clypéastre étaient les plus sensibles à des

échantillons donnés d'eau de porosité de sédiments provenant des ports de Vancouver et d'Halifax, tandis que l'oursin violet de l'Atlantique était l'espèce la plus sensible à l'ammoniac. Dans cette même étude, l'oursin violet du Pacifique et le clypéastre excentrique étaient les plus sensibles au cuivre (Jackman et Doe, 2004).

L'oursin plat *Echinarachnius parma* (Lamarck) n'a pas été souvent utilisé dans les essais toxicologiques et son rendement a été médiocre lors d'une évaluation interlaboratoire de l'essai sur la fécondation chez plusieurs espèces d'échinide (Miller et coll., 1992). Par conséquent, on ne recommande pas d'utiliser cette espèce, tant que la recherche n'aura pas montré qu'elle convient. La répartition circumpolaire de *E. parma*, y compris le long de la côte atlantique, du Canada jusqu'au Maryland (États-Unis), justifie une recherche plus poussée sur cette espèce. À Terre-Neuve, Osborne et Leeder (1989) ont eu recours à des spécimens adultes pour des essais toxicologiques étalés sur plusieurs mois. En outre, Karnofsky et Simmel (1963) et Meador et coll. (1990) ont respectivement étudié les effets de substances chimiques inhibant la croissance de cette espèce et les effets des contaminants présents dans les sédiments sur les premiers stades de son développement.

2.2 Étapes du cycle biologique, taille et provenance des organismes

On devrait se procurer des échinides matures (mâles laités et femelles œuvées) afin d'obtenir des *gamètes*. La taille des adultes est de ≥ 3 cm de diamètre, selon l'espèce (tableau 1); généralement, la taille des échinides utilisés en laboratoire est de 5-6 cm.

Tous les gamètes servant à l'essai devraient provenir d'adultes du même lot et de la même source. On peut prélever des spécimens des espèces indigènes dans des eaux marines côtières non contaminées, dont certaines en eau peu profonde à marée basse, ou plus au large

(cueillette en plongée). Par ailleurs, des échinides de toutes les espèces peuvent être achetés auprès de fournisseurs de matériel biologique. Les échinides adultes doivent être identifiés positivement jusqu'à l'espèce. Lorsque les organismes sont achetés auprès d'un fournisseur commercial, ce dernier devrait fournir une attestation de l'identification de l'espèce, de même que la référence taxinomique ou le nom du ou des taxinomistes consultés. Après avoir obtenu du fournisseur l'identification taxinomique de chaque espèce, le laboratoire d'essai peut procéder à la confirmation de l'espèce à laquelle appartiennent les organismes d'essai inclus dans le même envoi. Toute l'information nécessaire à l'identification adéquate des échinides adultes expédiés à un laboratoire d'essai doit accompagner chaque envoi. Les documents relatifs à chaque *lot* d'organismes d'essai doivent inclure, à tout le moins, le nombre et la provenance des organismes de chaque envoi, le nom du fournisseur, la date d'expédition, la date d'arrivée au laboratoire d'essai, l'état des organismes à l'arrivée et l'identification des espèces. Pour que le transport n'ait pas d'effet nocif sur la santé des échinides, il faudrait maintenir le plus possible les conditions de température, d'oxygène dissous (OD) et de *salinité* qui conviennent. Les contenants d'expédition devraient être isolés afin de réduire au minimum les écarts de température pendant le transport. Si les organismes ne peuvent être livrés au laboratoire la journée même de leur expédition, les contenants de transport devraient être entreposés de telle sorte que la température des échinides reste constante le plus possible. La température devrait être consignée au moment du départ de chez le fournisseur et au moment de l'arrivée au laboratoire d'essai.

D'après les périodes du frai indiquées au tableau 1, il est possible de réaliser des essais presque toute l'année si les organismes sont recueillis au moment opportun.

Tableau 1. Période du frai, taille et température de maintien des adultes dont les gamètes serviront à l'essai

Espèce	Période du frai*	Diamètre maximum de l'adulte (cm)**	Température de maintien au laboratoire (°C)***
Oursin vert	– avril (en général); mars à mai dans certains endroits au Canada; jusqu'en juin dans l'estuaire du Saint-Laurent (janvier, juin +)	8,3	12 ± 2 , ≤15
Oursin violet du Pacifique	– janvier à mai (en général); janvier à mars (période optimale) pour les organismes féraux; fin octobre jusqu'à avril sur la côte californienne (décembre, juin)	10	10 ± 2 , ≤17
Clypéastre excentrique	– mai à octobre (février à décembre)	9	13 ± 2 , ≤17
Oursin violet de l'Atlantique	– juin à août sur la côte atlantique; janvier à avril sur la côte du golfe du Mexique****	5,1	17 ± 2 , ≤22
Oursin blanc	– mars à novembre	♂ 2,8 ♀ 3,2	13 ± 2 , ≥8 et ≤17

* Les mois entre parenthèses sont ceux pendant lesquels la période du frai peut être prolongée en laboratoire en élevant ou en abaissant la température de maintien. Sources : documents de référence de l'annexe D; Meinkoth, 1981; NRC, 1981; Strathmann, 1987; Starr, 1990; chercheurs cités dans les remerciements.

** Taille maximale prévue. Pour la plupart des espèces, le diamètre des spécimens maintenus en laboratoire est de 5-6 cm.

*** Les chiffres en caractère gras constituent la plage optimale des températures recommandées pour obtenir des gamètes de façon naturelle. Sources : documents cités à l'annexe D; NRC, 1981; laboratoires du Canada et des États-Unis ayant répondu au questionnaire distribué avant l'établissement de cette deuxième édition de la méthode (v. 1.1). Le symbole ≤ (et le symbole ≥ dans le cas de l'oursin blanc) qui précède une valeur indique que celle-ci ne devrait pas être dépassée, et ce, afin d'éviter un frai spontané et/ou une mortalité accrue (v. 2.3.5). D'autres températures peuvent permettre d'accélérer ou de ralentir la maturation; on peut aussi maintenir la température de l'eau de mer naturelle d'arrivée.

**** Deux populations différentes sont fécondes à des moments différents de l'année (pendant l'été sur la côte atlantique et pendant l'hiver sur la côte du golfe du Mexique), ce qui assure une grande flexibilité dans l'obtention d'organismes d'essai frais (Biedenbach et Carr, comm. pers., 2008).

On peut prolonger la période d'essai en maintenant les adultes à des températures plus élevées ou plus basses afin de déclencher ou de retarder le frai, selon le cas. L'oursin vert n'est en état de reproduction que pendant quelques mois au printemps (v. tableau 1), mais les laboratoires canadiens peuvent obtenir des gamètes de cette espèce pendant presque toute l'année, si ce n'est toute l'année, en modifiant les conditions de maintien des organismes (Wells, 1982, 1984). Il est aussi possible de se

procurer des spécimens dont la période du frai coïncide avec la période à laquelle on souhaite faire l'essai. Il ne faudrait cependant pas oublier que la période et la durée du frai ainsi que la température optimale de provocation du frai ne sont pas nécessairement les mêmes chez les animaux d'origine et de milieux climatiques différents. Les oursins globuleux dont on provoque le frai au début de la période du frai peuvent parfois produire de nouveaux gamètes 4-6 semaines plus tard si on les alimente de

façon appropriée (Dinnel et Stober, 1985). Il faudrait toutefois les maintenir dans un réservoir distinct après le premier frai.

Il convient de s'assurer que les gamètes sont matures avant de s'en servir pour un essai toxicologique. Le sperme et les œufs recueillis en dehors de la principale période de maturation peuvent produire de faibles taux de fécondation et des résultats peu concluants. La détermination du degré de maturité demande une certaine expérience de la part du responsable de l'essai, mais on peut l'évaluer en provoquant le frai d'un échantillon d'échinides et en examinant les gamètes ainsi obtenus (v. 4.2.1). Les spermatozoïdes matures sont minuscules et deviennent rapidement très actifs dans l'eau de mer, tandis que les œufs matures deviennent sphériques. On reconnaît les œufs immatures à la présence d'une tache claire dans leur cytoplasme. Il est également possible de sacrifier quelques adultes pour examiner leurs gonades et recueillir directement les gamètes. Chez l'oursin globuleux, la coloration des ovaires matures varie du jaune au rouge selon l'espèce, et les testicules sont blancs.

L'expédition de spécimens très matures (c.-à-d. des mâles laités et des femelles œuvées) dans des conditions stressantes (comme des changements extrêmes de température) peut provoquer le frai ou la mortalité pendant le transport ou à l'arrivée au laboratoire. Par mesure préventive, on peut acclimater les animaux le plus possible aux conditions du laboratoire avant leur expédition. Les adultes devraient être expédiés dans des contenants renfermant des cryosacs afin de maintenir la température à 10 ± 2 °C. L'oursin violet du Pacifique peut être entouré d'algues ou d'une autre matière humide. Si les spécimens sont submergés dans l'eau aux fins du transport, cela peut provoquer une baisse de la teneur en oxygène. Par contre, le clypéastre excentrique devrait être expédié dans une petite quantité d'eau de mer refroidie. Si des échinides adultes fraient prématurément (c.-à-d. pendant le transport ou à l'arrivée au laboratoire), ils peuvent être séparés par sexe et isolés des

adultes qui n'ont pas frayé, puis transférés dans des réservoirs de maintien distincts.

Le transfert d'animaux d'un milieu marin à un autre soulève d'importants problèmes liés à l'introduction d'espèces non indigènes, de maladies et de parasites. Tout projet d'achat, d'expédition ou de transfert d'échinides devrait d'abord être approuvé par les autorités fédérales, provinciales ou régionales. Les gouvernements provinciaux peuvent exiger un permis d'importation de certaines espèces, qu'elles soient indigènes ou non. De plus, un comité fédéral-provincial sur l'introduction et l'implantation d'animaux peut exercer un contrôle sur le transfert d'organismes aquatiques. Les bureaux régionaux d'Environnement Canada (annexe C) peuvent fournir des renseignements sur les comités ou les organismes provinciaux compétents et sur les sources d'approvisionnement en échinides. On doit adresser les demandes de permis d'importation d'animaux au comité susmentionné, à l'organisme provincial responsable ou au directeur général régional du ministère des Pêches et des Océans (MPO), selon les directives en vigueur dans la région.

Les laboratoires d'essai peuvent être tenus de créer et d'utiliser une aire de quarantaine dans leurs installations pour y isoler les organismes ou gamètes importés et pour y stériliser et éliminer, conformément aux règlements provinciaux ou fédéraux, l'équipement et les liquides entrant en contact avec les organismes d'essai ou les gamètes. Il est possible, également, que des organismes provinciaux ou le MPO exigent des laboratoires qu'ils établissent des modes opératoires normalisés décrivant en détail leurs procédures de mise en quarantaine.

2.3 Maintenance et acclimatation des adultes dans le laboratoire

2.3.1 Généralités

On maintient les groupes d'échinides mâles et femelles dans des réservoirs afin d'obtenir les gamètes nécessaires aux essais. Il n'existe

aucune restriction quant au temps pendant lequel les adultes peuvent ou doivent être maintenus à cette fin. Des laboratoires ont réussi à maintenir en état de reproduction des spécimens des 5 espèces pendant de longues périodes (3-12 mois). Il a toutefois été signalé que ce maintien était plus facile dans le cas de l'oursin violet de l'Atlantique et de l'oursin blanc. Les rapports concernant l'oursin violet du Pacifique et le clypéastre excentrique varient quant à la facilité avec laquelle les spécimens peuvent être maintenus pendant de longues périodes. De nombreux laboratoires du Canada ont opté pour l'achat de spécimens de ces 2 espèces d'essai auprès d'un fournisseur commercial lorsqu'ils doivent procéder à des essais, et ils provoquent le frai la journée même de l'arrivée des adultes au laboratoire ou quelques jours après (c.-à-d. sans véritable *acclimatation*). Les problèmes associés au maintien de ces espèces pendant une longue période incluent les suivants : les adultes fraient spontanément avant les essais ou seulement pendant une courte période après leur arrivée au laboratoire; il est difficile de les maintenir en santé ou vivants pendant >3 mois. En conséquence, cette deuxième édition du rapport SPE 1/RM/27 prévoit la possibilité de « maintenir des adultes pour utilisation immédiate » – en d'autres termes, les gamètes peuvent être recueillis à l'intérieur d'une courte période (≤ 3 jours) après l'arrivée des adultes au laboratoire¹.

¹ Parmi les laboratoires du Canada et des États-Unis ayant déjà mené des essais sur la fécondation chez les échinides (v. 1.1) et qui ont répondu à notre questionnaire, plusieurs ont indiqué qu'il était difficile de maintenir l'oursin violet du Pacifique et le clypéastre excentrique pendant une période prolongée, de sorte que la provocation du frai a lieu la journée même de l'arrivée des adultes au laboratoire ou quelques jours après (c.-à-d. sans *acclimatation*). Il n'est pas absolument nécessaire d'acclimater les échinides adultes pendant plusieurs jours aux conditions de l'essai, étant donné que ce ne sont pas eux, mais bien leurs gamètes qui sont utilisés pour l'essai sur la fécondation. Du moment que les organismes d'essai peuvent produire des gamètes viables, conformes au critère de validité de l'essai (v. 4.5.1), des gamètes peuvent être recueillis la journée même de l'arrivée des adultes au laboratoire ou quelques jours après.

Lorsqu'il faut provoquer le frai et soumettre les gamètes à l'essai dans les 3 jours suivant l'arrivée des adultes au laboratoire, on devrait au préalable obtenir du fournisseur la confirmation que les adultes sont matures et que les œufs sont viables. La température à laquelle les organismes d'essai sont expédiés devrait correspondre le plus possible à celle des conditions de l'essai, étant donné que le temps d'acclimatation en laboratoire sera très bref, sinon inexistant. Même s'ils sont « maintenus pour utilisation immédiate », les adultes devraient être acclimatés aux conditions de laboratoire le plus graduellement possible, afin que le stress que provoquerait un changement rapide de ces conditions chez les adultes ayant atteint la maturité sexuelle n'influe pas sur les résultats de l'essai portant sur leurs gamètes (v. le critère de validité de l'essai en 4.5.1). Il est recommandé d'exposer graduellement les échinides adultes à l'eau témoin/de dilution du laboratoire dans tous les cas, mais plus particulièrement lorsqu'il y a un écart marqué quant à la qualité (c.-à-d. la température, la *salinité* et le *pH*) des conditions d'acclimatation antérieures. Cette exposition graduelle devrait réduire au minimum le stress causé par des caractéristiques différentes dans la qualité de l'eau.

Dans le cas des adultes dont on provoque le frai le jour de leur arrivée au laboratoire, il faut prévoir une période de maintien de ≥ 3 h, période pendant laquelle on pourra observer leur état de santé en général et effectuer une transition entre les conditions d'expédition (température et eau) et les conditions d'essai. Si les adultes sont expédiés dans de l'eau, leur acclimatation peut se faire comme suit : maintien pendant 1-2 h dans un mélange constitué de 50 % d'eau d'expédition et de 50 % d'eau témoin/de dilution, puis pendant 1-2 h dans un mélange constitué de 25 % d'eau d'expédition et de 75 % d'eau témoin/de dilution, après quoi le maintien se fait dans une eau témoin/de dilution à 100 %, toujours pendant 1-2 h, avant la provocation du frai. Une autre méthode utile consiste à siphonner 20-30 % de l'eau d'expédition toutes les 1-2 h

et à la remplacer par de l'eau témoin/de dilution jusqu'à ce qu'au moins 3 remplacements aient été effectués. Les adultes expédiés à l'état « sec » (c.-à-d. dans des essuie-tout humides ou des algues) n'ont pas besoin d'être placés dans l'eau témoin/de dilution avant la provocation du frai; il faut cependant prévoir une période d'observation de 3 h avant la provocation du frai. Pendant cette période, on devrait ajuster le plus graduellement possible leur température (c.-à-d. celle de l'air) par rapport à celle de l'essai, au besoin. La transition entre les conditions d'expédition et les conditions d'essai devrait commencer le plus tôt possible après l'arrivée au laboratoire des échinides adultes à maturité sexuelle.

Certains laboratoires du Canada et des États-Unis ont réussi à maintenir le clypéastre excentrique et l'oursin violet du Pacifique pendant de longues périodes. Leur succès est peut-être attribuable à l'utilisation de systèmes relativement simples faisant appel à beaucoup d'eau de mer naturelle non contaminée coulant en continu dans les réservoirs de maintien². Dans le cas de l'oursin violet du Pacifique, les conditions de maintien pourraient inclure des températures de <15 °C, une teneur élevée en OD, un pH >8, un bon écoulement d'eau, l'enlèvement rapide des matières fécales et le maintien des organismes dans l'obscurité (Bay et Greenstein, comm. pers., 2008; Buday, comm. pers., 2008). Les problèmes qu'ont éprouvés d'autres laboratoires pourraient être attribuables à une combinaison de conditions défavorables pendant le transport, à une circulation inadéquate de l'eau de mer dans les réservoirs de maintien et à une exposition prolongée à des sels de mer artificiels dont la source et le mélange sont étrangers aux échinides.

² Comparativement aux laboratoires utilisant des réservoirs sans renouvellement, ceux disposant de systèmes à recirculation d'eau ont eu plus de succès (taux de mortalité moindre) dans le maintien de groupes d'oursins violets du Pacifique pendant de longues périodes, selon une enquête récente auprès de laboratoires du Canada et des États-Unis (v. 1.1).

Il s'est avéré facile de maintenir en laboratoire l'oursin violet de l'Atlantique et l'oursin blanc pendant de longues périodes (>1 an), et le frai a pu être provoqué à répétition chez les 2 espèces (toutes les 4-6 semaines) pendant tout ce temps lorsque les conditions étaient adéquates (Doe et Jackman, comm. pers., 2008; Jonczyk et Holtze, comm. pers., 2008; Carr, Nipper et Biedenbach, comm. pers., 2008). Les 2 espèces peuvent être séparées par sexe et placées dans des aquariums distincts aux fins du prélèvement du nombre de mâles et de femelles dont on a besoin pour les essais. La plupart des laboratoires signalent que l'acclimatation et le maintien ont entraîné très peu de mortalité chez les 2 espèces, qu'il est par ailleurs facile d'acclimater et de maintenir dans des aquariums fermés à dispositif de recyclage et à température contrôlée.

Dans le cas des échinides adultes qui seront maintenus en laboratoire pendant des périodes prolongées (>3 jours), il est souhaitable de procéder graduellement à l'acclimatation pendant au moins 3-4 jours à la température et à la *salinité* de l'essai, dans l'eau qui sera utilisée pour les témoins et les dilutions, avant de procéder à la collecte des gamètes. L'acclimatation devrait commencer le plus tôt possible après l'arrivée des adultes au laboratoire. La nécessité de recourir à des méthodes convenant au « maintien pour utilisation immédiate » ou à l'acclimatation graduelle dans des conditions propices au maintien à long terme est fonction des exigences de l'essai concernant l'obtention de gamètes viables, conformes aux besoins et au critère de validité de l'essai (v. 4.5.1).

Il faut manipuler les échinides avec soin et éviter de leur imposer des chocs ou de changer les conditions de maintien. Les variations importantes de température ou de pression hydrostatique, en particulier, peuvent déclencher le frai à un moment qui ne convient pas au responsable de l'essai (Dinnel et Stober, 1985). Dans certains laboratoires utilisant de l'eau de mer naturelle n'ayant pas subi de microfiltration, on a constaté qu'un frai massif se produit chez les oursins globuleux au

moment des efflorescences planctoniques, phénomène qui a pu être observé dans les eaux canadiennes (Starr, 1990; Starr et coll., 1990). De plus, le frai de certains spécimens étant susceptible de provoquer celui d'autres organismes, on devrait isoler immédiatement ces spécimens pour éviter un frai massif.

Dans le cas des échinides qui seront maintenus en laboratoire pendant des périodes prolongées (>3 jours), les recommandations concernant les conditions de maintien, décrites ci-dessous dans les sous-sections 2.3.2 à 2.3.10 et résumées dans les tableaux 1 et 2, ont été formulées de façon à permettre une certaine souplesse, tout en normalisant les conditions qui, si elles ne sont pas contrôlées, pourraient nuire à la santé des animaux ou à la viabilité de leurs gamètes. Le cas échéant, des conseils sur le « maintien pour utilisation immédiate » (c.-à-d. lorsque le frai est provoqué dans les 3 jours suivant l'arrivée des adultes au laboratoire) sont également fournis. Les conditions recommandées sont généralement tirées des documents listés à l'annexe D, de même que des avis et suggestions des laboratoires du Canada et des États-Unis ayant répondu au questionnaire (v. 1.1). On trouvera d'autres détails et justifications dans certains documents inclus dans l'annexe D et les Références, en particulier ASTM (1990), USEPA (1988, 1994, 1995, 2002) et NCASI (1991), ainsi que dans les articles de Dinnel et coll. mentionnés dans les Références et à l'annexe E. En outre, le site Web de l'université Stanford, <http://stanford.edu/group/Urchin/>, présente des détails utiles sur les soins et l'embryologie des échinides.

2.3.2 Réservoirs de maintien

On peut garder les organismes adultes dans des aquariums, des bassins ou des réservoirs faits de

matériaux non toxiques comme le verre, l'acier inoxydable, la porcelaine, le polyester renforcé de fibre de verre, les plastiques de perfluorocarbone (Téflon^{MC}), l'acrylique, le polyéthylène ou le polypropylène. Les réservoirs d'une capacité de 50-150 L munis d'une colonne d'alimentation sont les plus courants. Ils devraient être placés à l'abri de perturbations physiques importantes et, de préférence, à l'écart de l'endroit où auront lieu les essais. De plus, de façon à prévenir un frai massif indésirable, les groupes ne devraient pas compter plus de 20 adultes.

La profondeur de l'eau des réservoirs contenant les oursins globuleux devrait être de ≥ 20 cm. Dans le cas des oursins plats, on utilise souvent des plateaux de 1 m \times 2 m contenant 10 cm d'eau et 2-3 cm de sédiment ou de sable riche en débris, notamment des cellules algales décantées.

2.3.3 Éclairage

Les conditions d'éclairage qu'utilisent actuellement les laboratoires du Canada et des États-Unis pour le maintien des échinides varient grandement : éclairage ambiant du laboratoire (100-500 lux), avec photopériode de 16 h de clarté et de 8 h d'obscurité; lumière naturelle extérieure et photopériode saisonnière (les réservoirs sont à l'extérieur du laboratoire); obscurité totale. Dans le cas des oursins globuleux, l'éclairage et la photopériode semblent peu importants, la pratique la plus courante étant l'éclairage normal de faible intensité du laboratoire. Quant aux oursins plats, un appareil fluorescent suspendu, fournissant un éclairage équivalant à celui d'un bureau bien éclairé, stimule la croissance des algues qui se trouvent dans le sédiment. De cette façon, les oursins plats peuvent devenir autosuffisants sur le plan alimentaire.

Tableau 2. Liste de contrôle des conditions et des méthodes recommandées pour le maintien et l'acclimatation des échinides

Provenance des adultes	– prélevés dans des eaux non contaminées ou achetés chez des fournisseurs de matériel biologique
Eau	– <i>eau de mer</i> naturelle ou <i>reconstituée</i> (artificielle), non contaminée; écoulement continu ou renouvellement périodique (p. ex., toutes les 24 h); salinité moyenne de 28-34 g/kg, toujours dans une plage de 25-36 g/kg; changement du taux de salinité de ≤ 5 g/kg par jour pour les adultes maintenus pendant >3 jours; en général, débit fournissant 5-10 L par jour et par animal et renouvelant l'eau du réservoir en 6-12 h
Température	– 10-17 °C selon l'espèce; température légèrement inférieure ou supérieure pour retarder ou provoquer le frai (v. tableau 1); taux de changement de la température de ≤ 5 °C par jour pour les adultes maintenus pendant >3 jours
Oxygénation/aération	– OD : 80-100 % de saturation; valeurs maintenues par aération avec de l'air filtré exempt d'huile, au besoin
pH	– entre 7,5 et 8,5, de préférence $8,0 \pm 0,2$
Qualité de l'eau	– surveillance de la température, de la salinité, de l'OD, du pH et du débit de tous les réservoirs, de préférence quotidiennement
Éclairage	– éclairage normal du laboratoire à faible intensité, soit 16 h de clarté et 8 h d'obscurité; lumière naturelle et <i>photopériode</i> saisonnière; obscurité totale – on considère que les conditions d'éclairage n'ont pas une importance critique
Alimentation	– oursins globuleux : varech, autres macroalgues ou laitue romaine, épinards et carottes; oursins plats : détritus et algues présents dans le sédiment – prévoir un éclairage suffisant pour stimuler la croissance des algues et, au besoin, ajouter des algues de culture ou de la pâte d'algues
Nettoyage	– enlèvement des algues décomposées, des matières fécales et des débris, chaque jour ou au besoin, à moins que ces éléments ne servent de nourriture
Maladie/mortalité	– surveillance de la mortalité quotidiennement; pour les adultes maintenus pendant >3 jours, la mortalité devrait être de ≤ 2 % par jour en moyenne pendant les 7 jours précédant la collecte des gamètes, et la mortalité cumulative pendant cette même période doit être de ≤ 20 %; pour les adultes maintenus pendant ≤ 3 jours, la mortalité cumulative doit être de ≤ 20 %; enlèvement des animaux malades ou moribonds – on devrait éliminer les groupes d'animaux malades

Pour les échinides adultes maintenus pendant une période prolongée (>3 jours) avant la collecte des gamètes utilisés dans l'essai, on recommande le niveau d'éclairage ambiant du laboratoire (100-500 lux), avec photopériode de 16 h de clarté et de 8 h d'obscurité. Quant aux réservoirs installés à l'extérieur, la lumière naturelle et la photopériode saisonnière sont recommandées.

Des laboratoires ont signalé que l'oursin violet du Pacifique a pu être maintenu avec succès dans l'obscurité totale pendant des périodes prolongées. Une obscurité constante pourrait perturber certains schémas saisonniers donnant le signal du frai et faire en sorte que les gonades des animaux resteront matures plus longtemps (Bay, comm. pers., 2008). Lorsque les adultes sont transférés à un laboratoire d'essai en vue de la collecte des gamètes la journée même ou dans les 3 jours qui suivent, il est recommandé de prévoir des conditions d'éclairage représentatives de celles utilisées pour l'essai.

2.3.4 Eau

On devrait renouveler continuellement ou périodiquement l'eau des réservoirs dans lesquels les adultes sont maintenus afin de prévenir l'accumulation de déchets métaboliques. On peut utiliser de l'eau de mer naturelle non contaminée ou de l'eau de mer reconstituée (artificielle) dont la salinité est ajustée conformément aux méthodes recommandées dans EC (2001). Il faudrait s'assurer au préalable que les sels de mer du commerce (p. ex., Instant Ocean^{MC}, Ocean Pure Sea Salt^{MC}, Red Sea Salt^{MC}) ou le mélange approprié de sels de qualité réactif (p. ex., GP2; v. Bidwell et Spotte, 1985, ou le tableau 2 dans USEPA, 1994 ou 1995) utilisés pour préparer l'eau de mer reconstituée assureront un bon taux de survie et le maintien en santé des échinides, et ce, de façon constante et fiable. L'approvisionnement en eau devrait être surveillé et évalué aussi souvent que possible

pour en documenter la qualité. Il faudrait aussi mesurer, de préférence quotidiennement, la température, la salinité, l'OD, le pH et le débit de chaque réservoir. Les variables suivantes devraient également être mesurées aussi souvent que nécessaire pour documenter la qualité de l'eau : gaz dissous totaux, ammoniac, azote, nitrite, métaux, pesticides, solides en suspension totaux, carbone organique total.

Pour assurer le maintien optimal d'une eau de grande qualité, on devrait veiller à ce que le débit de l'eau dans les systèmes « sans recyclage » soit de ≥ 5 -10 L par jour et par organisme et qu'il permette de renouveler la totalité de l'eau du réservoir en 6-12 h. Dans le cas des réservoirs sans renouvellement, le remplacement quotidien de la plus grande partie de l'eau constitue une méthode acceptable. D'après les méthodes utilisées (annexe D) et les réponses des laboratoires du Canada et des États-Unis à notre questionnaire (v. 1.1), il ne semble pas exister de consensus quant à la quantité optimale d'eau à utiliser, ni quant à la fréquence de renouvellement souhaitable³. Le plus souvent, le débit n'est pas précisé et, dans les rares cas où on trouve des indications à ce

³ Certains de ces laboratoires utilisent des taux de renouvellement moins qu'optimaux. Ceux qui ont recours à des systèmes de maintien sans renouvellement signalent que la capacité de leurs réservoirs va de 10 L à presque 600 L, les taux de renouvellement allant de 50 % par jour à 100 % toutes les semaines ou 2 semaines. Les laboratoires disposant de grands réservoirs de maintien ont indiqué qu'ils utilisaient de l'eau de mer naturelle et des systèmes de recirculation munis de biofiltres de grande capacité. Dans les réservoirs sans renouvellement, la densité de charge variait de 1 organisme/L à 1 organisme/10 L; dans la plupart des cas, cette densité était de 1-4 organismes/L. Les laboratoires ayant signalé des densités de charge plus élevées faisaient aussi état de taux de renouvellement plus fréquents. Enfin, dans les laboratoires dotés de systèmes à recyclage d'eau, le volume des réservoirs était de 100-150 L et le débit, de ~ 5 L/min.

sujet, ce débit varie de centaines de litres par jour et par animal, la totalité de l'eau du réservoir étant renouvelée en quelques minutes, à des débits beaucoup plus faibles correspondant à un renouvellement de l'eau du réservoir en ~5 h. Dans NCASI (1991, 1992), les débits d'eau de mer sont similaires à ceux recommandés ici, soit 7-14 L par jour et par oursin plat et le remplacement de toute l'eau du réservoir en 1,3-2,7 h.

On peut fixer des taux de renouvellement et des densités de charge « moins qu'optimums » à la condition que le critère de survie dans les réservoirs de maintien (v. 2.3.10) et le critère de validité de l'essai (v. 4.5.1) soient respectés. Il est fortement conseillé de *surveiller* régulièrement la qualité de l'eau et de documenter ses variables (ammoniac et nitrite, en particulier) dans les réservoirs de maintien. Les valeurs obtenues devraient être comparées aux cibles recommandées afin de s'assurer que les déchets métaboliques n'atteignent pas des niveaux nocifs dans les réservoirs. Les valeurs cibles recommandées pour la protection des organismes aquatiques sont les suivantes : $\leq 0,02$ mg/L pour l'ammoniac non ionisé et $\leq 0,06$ mg/L pour le nitrite (CCMRE, 1987)⁴.

La *salinité* moyenne de l'eau utilisée pour le maintien des organismes devrait être de 28-34 g/kg, de préférence 30-32 g/kg. Les valeurs extrêmes de la salinité ne doivent pas être de ≤ 25 g/kg ou de ≥ 36 g/kg dans les

réservoirs de maintien des échinides⁵. Pour les organismes devant être maintenus au laboratoire pendant une longue période, le taux d'ajustement de la salinité devrait être de ≤ 3 g/kg par jour et ne doit pas dépasser 5 g/kg par jour. Dans certains cas (p. ex., adultes dont le frai est provoqué pour les essais le jour de leur arrivée au laboratoire), ce taux peut être de ≥ 5 g/kg par jour. Bon nombre de laboratoires ont signalé que, pour les essais qui commencent la journée même ou le lendemain de l'arrivée des adultes au laboratoire, les changements rapides de la salinité, de l'ordre de 6-8 g/kg, n'ont eu aucun effet sur les gamètes des organismes d'essai. Néanmoins, pour les adultes « maintenus pour utilisation immédiate » (p. ex., dans les 3 jours suivant leur arrivée au laboratoire), les ajustements de la salinité devraient être le plus graduels possible. Toutefois, on peut procéder à un ajustement quotidien de >5 g/kg si le critère de validité de l'essai peut être satisfait (v. 4.5.1) et si la sensibilité des gamètes n'est pas touchée lors de l'essai sur la *toxique de référence* (v. 4.6).

Il existerait des différences spécifiques dans la tolérance à la salinité chez les échinides mentionnés dans le présent document. Au cours

⁵ La *salinité* moyenne des océans est de 34,7 g/kg; elle se situe entre 32 et 37 g/kg, sauf dans l'Arctique et sur les littoraux, où elle peut être de <30 g/kg, et dans les régions chaudes caractérisées par un taux d'évaporation élevé, où elle peut être de >40 g/kg (Thurman, 1975; McCormick et Thiruvathukal, 1976). Les échinodermes sont reconnus pour leur osmolalité et pour leur faible tolérance aux variations de salinité. Himmelman et coll. (1984) ont montré que la capacité de l'oursin vert à se retourner lorsqu'on le place sur le dos diminuait quand la salinité normale de 30 g/kg était abaissée à 24-25 g/kg, et que cette capacité était un indicateur important de l'état physiologique et de la santé de l'animal. Parmi les méthodes de maintien des échinides, celles qui traitent de la salinité recommandent des valeurs inférieures à la salinité type en milieu océanique; on la situe le plus souvent à 27-30 g/kg, avec des valeurs extrêmes de 25-35 g/kg (v. annexe D). Les recommandations du présent rapport, en particulier celles concernant les valeurs inférieures, ont été établies à partir de la salinité normale des eaux littorales et des eaux utilisées dans des expériences réussies de maintien d'échinides (v. 4.3.2).

⁴ Les valeurs cibles recommandées ont été formulées pour les organismes dulcicoles, mais elles devraient également permettre de protéger les organismes marins. Aucun critère n'a été établi clairement concernant la teneur en ammoniac de l'eau de mer, mais il existe beaucoup de documentation sur les valeurs recommandées pour l'eau douce. Dans des conditions normales, en milieu marin, il est peu probable que la teneur en nitrite dépasse les valeurs recommandées.

d'une enquête récente (v. 1.1), certains laboratoires du Canada et des États-Unis ont signalé que des salinités plus élevées (34-35 g/kg) conviennent mieux à l'oursin violet du Pacifique et à l'oursin blanc, tandis que d'autres ont indiqué qu'ils avaient pu maintenir sans difficulté ces espèces à des salinités de 28-30 g/kg. Dans le cas de l'oursin blanc, des salinités de <28 g/kg pourraient entraîner un stress et une mortalité élevée chez les animaux. Certains laboratoires ont constaté que le clypéastre excentrique est légèrement plus sensible à des changements marqués de la salinité ainsi qu'à des salinités de <32 g/kg.

L'eau qui pénètre dans les récipients ne devrait pas être sursaturée en gaz, ce qui peut se produire si l'eau est chauffée. Si ce phénomène risque de se produire, il vaudrait mieux vérifier régulièrement la pression totale des gaz (Bouck, 1982). Si la teneur en gaz dissous dépasse 100 % de saturation, on doit recourir à des mesures correctives (p. ex., utilisation de colonnes d'aération ou aération vigoureuse dans un réservoir ouvert).

Si on utilise de l'eau de mer reconstituée (artificielle) comme eau témoin et eau de dilution (v. 4.1.1 et 5.3) et que les adultes doivent être maintenus pendant >3 jours après leur arrivée au laboratoire, il faudrait laisser les adultes s'acclimater à cette eau pendant ≥3 jours avant de provoquer le frai. De plus, si on doit maintenir les échinides dans de l'eau de mer reconstituée ou si les réserves d'eau de mer sont limitées, il pourrait être nécessaire d'avoir recours à la filtration et à la recirculation de l'eau, ou encore de renouveler l'eau périodiquement dans les systèmes sans renouvellement. Il faudrait ensuite mesurer fréquemment la teneur de l'eau en ammoniac et en nitrite afin de s'assurer qu'elle n'atteint pas des niveaux nocifs.

Si de l'eau de mer reconstituée (artificielle) doit être utilisée, il faut la maintenir à la salinité souhaitée par l'ajout de *saumure hypersaline* (SHS) et/ou de sels de mer secs du commerce ou de sels de qualité réactif, à un volume approprié

d'eau douce [v. EC (2001) pour des indications à cet égard]. La salinité de la SHS devrait être de 90 ± 1 g/kg. Toute eau de mer reconstituée préparée par ajout direct de sels secs doit être aérée vigoureusement pendant ≥24 h avant l'emploi (EC, 2001); toutefois, un vieillissement plus long (≥3 jours) avec aération est conseillé⁶.

Il est recommandé d'utiliser une SHS provenant d'une source d'eau de mer naturelle non contaminée et de grande qualité (EC, 2001), mais on peut aussi préparer une SHS artificielle au moyen de sels de mer secs du commerce (p. ex., Instant Ocean^{MC}) ou de sels de qualité réactif (« GP2 modifié »; voir Bidwell et Spotte, 1985, ou le tableau 2 dans USEPA, 1994 ou 1995). Cependant, toute SHS préparée au moyen de sels de mer secs du commerce ou de sels de qualité réactif doit être passée à travers un filtre à pores de ≤1 µm et aérée pendant ≥24 h avant l'emploi; des périodes plus longues de vieillissement (≥3 jours) avec aération sont cependant recommandées⁶. Une fois filtrée, la SHS préparée à partir d'eau de mer naturelle peut servir immédiatement pour ajuster la

⁶ Une recherche a révélé que le type (c.-à-d. la marque) de sels de mer du commerce et la façon dont les sels sont préparés peuvent avoir une influence notable sur les résultats des essais toxicologiques. Au cours de cette recherche, on a utilisé divers types de sels de mer artificiels préparés selon des techniques différentes pour comparer le succès de la fécondation chez l'oursin violet du Pacifique. Six marques commerciales (Instant Ocean^{MC}, Crystal Sea Marine Mix^{MC}, Kent Sea Salt^{MC}, Sea Chem Reef Salt^{MC}, Ocean Pure Sea Salt^{MC} et Red Sea Salt^{MC}) ont été préparées selon différents traitements (*eau désionisée* et *eau déchlorée*, aération et aucune aération, vieillissement pendant 24 h et pendant 48 h). Les résultats montrent que les préparations de Ocean Pure Sea Salt^{MC} et de Red Sea Salt^{MC}, vieilles pendant ≥48 h et aérées, ont donné le plus haut taux de fécondation (comparable aux taux observés dans l'eau de mer naturelle filtrée et stérilisée) (Pickard et coll., 2008). Par ailleurs, des laboratoires du Canada et des États-Unis ayant déjà mené des essais sur la fécondation chez les échinides et ayant répondu à notre questionnaire (v. 1.1) ont indiqué qu'il serait préférable que l'eau reconstituée ou la SHS préparée par ajout direct de sels secs soit vieillie (et aérée) pendant ≥48 h, de préférence pendant ≥3 jours jusqu'à 1-2 semaines. Les répondants ont mentionné que l'absence de vieillissement de l'eau entraînait une baisse de la fécondation des œufs.

salinité. Les portions non utilisées de la SHS (naturelle ou artificielle) devraient être conservées dans des récipients fermés entreposés dans l'obscurité à 4 ± 2 °C (EC, 2001). En outre, les laboratoires d'essai devraient se procurer des sels de mer du commerce de la « meilleure qualité » (p. ex., Forty Fathoms^{MC} pour essais toxicologiques) auprès de leur fournisseur. Avant d'utiliser de l'eau de mer artificielle pour préparer la SHS ou l'eau témoin/de dilution, il faudrait évaluer l'adéquation et l'uniformité de tout nouveau produit ou lot de produits pour déterminer lequel permet de satisfaire au critère de validité de l'essai (v. 4.5.1) (EC, 2001). Ainsi, des responsables d'essai sont d'avis que certains types et/ou lots de sels de mer peuvent provoquer une réduction du taux de fécondation chez les témoins, avoir des effets toxiques indésirables et/ou emprisonner les substances d'essai. Si la SHS ou l'eau témoin/de dilution est préparée avec des sels de mer, on devrait en vérifier l'adéquation et l'uniformité au moyen de tests.

La SHS provenant d'une eau de mer naturelle peut être préparée en concentrant de l'eau de mer (naturelle ou artificielle, cette dernière étant moins souhaitable) par congélation ou évaporation. On devrait passer l'eau de mer à travers un filtre à pores de ≥ 10 µm avant de la mettre au congélateur ou dans l'enceinte d'évaporation. La salinité de la saumure ainsi préparée devrait être de 90 ± 1 g/kg (EC, 2001). Si la saumure est préparée par congélation, il faut congeler l'eau de mer à une température allant de -10 °C à -20 °C pendant ≥ 6 h, puis recueillir la SHS sous la glace lorsque la salinité a atteint 90 ± 1 g/kg. Si la SHS est obtenue par évaporation, il faut chauffer l'eau de mer à ≤ 40 °C dans un contenant résistant à la corrosion et fait d'un matériau non toxique, tout en l'aérant, jusqu'à la salinité souhaitée (90 ± 1 g/kg) (USEPA, 1994, 1995; EC, 2001). Peu importe la technique utilisée (congélation ou évaporation), la salinité de la saumure devrait être surveillée pendant la préparation – elle ne doit pas excéder 100 g/kg. La SHS peut être ajoutée à de l'eau de mer naturelle, à de

l'eau douce, à de l'eau distillée, à de l'eau désionisée ou aux échantillons d'essai, pour porter la salinité au taux souhaité pour les essais. EC (2001) donne la marche à suivre pour la préparation, le vieillissement et l'entreposage de la SHS. Si on utilise de la saumure dont la salinité est de 90 g/kg pour préparer l'eau témoin/de dilution à une salinité de 30 g/kg (v. 3.4 et 4.1.1), la concentration d'effluent (ou autre échantillon d'eau douce) qu'il est possible d'obtenir dans la solution d'essai ne pourra être supérieure à 67 %⁷. Cependant, si on ajuste la salinité de l'échantillon par ajout direct de sels secs à l'échantillon d'eau douce, alors la toxicité peut être déterminée à une concentration d'essai de 100 %.

Pour préparer de l'eau de mer reconstituée, on peut se servir d'eau désionisée, d'eau distillée, d'eau de surface ou d'eau souterraine non contaminée ou d'eau potable municipale déchlorée. Si on se sert d'eau municipale ou d'eau douce naturelle, on devrait en déterminer la teneur en substances chimiques, comme celles dont il est question au début de la présente sous-section (2.3.4), afin d'évaluer la qualité de cette eau.

S'il faut utiliser de l'eau potable municipale pour préparer de l'eau de mer reconstituée, on doit assurer une déchloration efficace de l'eau, de sorte qu'elle soit exempte de toute concentration nocive de chlore. La teneur en chlore résiduel total de l'eau dans les réservoirs de maintien et de l'eau témoin/de dilution est de $\leq 0,002$ mg/L (CCMRE, 1987). Le chlore disponible, même à des concentrations aussi faibles que 0,05 mg/L, possède une puissante action spermicide chez les échinides (Muchmore et Epel, 1973). Il est possible d'éliminer le chlore volatil de l'eau en aérant cette dernière vigoureusement. Il est recommandé d'utiliser des filtres au charbon activé (charbon d'os) et, ensuite, le rayonnement ultraviolet (Armstrong et Scott,

⁷ La solution devra être composée de saumure à 33 % pour que sa salinité atteigne le niveau souhaité.

1974) pour éliminer la chloramine résiduelle et les autres composés organiques chlorés⁸.

2.3.5 Température

Les échinides peuvent être maintenus en laboratoire dans la gamme optimale des températures indiquées au tableau 1, mais on peut également les maintenir à la température saisonnière normale (celle de l'eau de mer naturelle fournie au laboratoire). Il faudrait maintenir la température optimale pré-frai à 12 ± 2 °C pour l'oursin vert, 10 ± 2 °C pour l'oursin violet du Pacifique, 13 ± 2 °C pour le clypéastre excentrique, 17 ± 2 °C pour l'oursin violet de l'Atlantique et 13 ± 2 °C pour l'oursin blanc⁹.

On peut maintenir des groupes d'adultes en vue d'un frai différé à des températures inférieures aux normales saisonnières de leur habitat; les valeurs précises varient selon l'espèce et la longueur du report prévu. Des laboratoires ayant répondu au questionnaire ont toutefois indiqué qu'ils maintenaient rarement les adultes à des températures inférieures, car cela n'est généralement pas nécessaire pour retarder le frai. L'oursin violet de l'Atlantique et l'oursin blanc peuvent être maintenus au laboratoire pendant de longues périodes, de sorte qu'il est inutile d'abaisser la température pour retarder le frai. Cependant, on a signalé que l'oursin violet de l'Atlantique s'alimente et se régénère plus rapidement si la température de maintien est de 15 °C après le frai. Il est également possible d'élever la température pour stimuler le développement hâtif des gamètes. On devrait cependant éviter les températures excessivement

élevées afin de prévenir un frai spontané et de ne pas imposer un stress aux animaux. On recommande de ne pas dépasser 15 °C pour l'oursin vert, 17 °C pour l'oursin violet du Pacifique et le clypéastre excentrique, 22 °C pour l'oursin violet de l'Atlantique et 17 °C pour l'oursin blanc. Cette dernière espèce ne devrait pas être maintenue à des températures inférieures à 8 °C.

Il est conseillé d'*acclimater* graduellement les animaux à la température d'essai avant la collecte des gamètes, même si cette collecte a lieu le jour même ou le lendemain de l'arrivée des adultes reproducteurs au laboratoire. La température de l'eau devrait être portée à la valeur souhaitée à raison de ≤ 5 °C par jour. Dans certains cas (p. ex., adultes dont le frai est provoqué pour les essais le jour de leur arrivée au laboratoire), ce taux peut être de ≥ 5 °C. Pour ajuster rapidement la température corporelle des adultes maintenus pendant ≤ 3 jours avant la provocation du frai, il faudrait utiliser la méthode décrite en 2.3.1 pour le mélange de l'eau de maintien (ou de l'eau d'expédition) et de l'eau témoin/de dilution¹⁰.

2.3.6 Oxygène dissous

La teneur en OD de l'eau des réservoirs de maintien devrait se situer entre 80 % et 100 % de saturation en air. Au besoin, on peut assurer une légère aération de l'eau au moyen d'air comprimé filtré et exempt d'huile pour atteindre cette teneur. L'aération à l'aide de pierres de barbotage d'aquarium du commerce facilite le mélange. On devrait éviter une agitation trop vigoureuse.

⁸ Du thiosulfate ou d'autres produits chimiques qui éliminent efficacement le chlore résiduel ne devraient pas être ajoutés à l'eau de mer reconstituée qui sera utilisée comme eau témoin/de dilution dans les essais toxicologiques, car ils pourraient modifier la toxicité des échantillons.

⁹ Au début de la période du frai ou immédiatement avant, il pourrait être souhaitable de maintenir les organismes à des températures un peu plus basses que celles indiquées afin d'empêcher le frai. On devrait demander conseil aux personnes chargées de prélever les animaux à des endroits donnés.

¹⁰ Les adultes sont maintenus 1-2 h dans un mélange constitué de 50 % d'eau d'expédition et de 50 % d'eau témoin/de dilution, puis pendant 1-2 h dans un mélange constitué de 25 % d'eau d'expédition et de 75 % d'eau témoin/de dilution, après quoi le maintien se fait dans une eau témoin/de dilution à 100 %, toujours pendant 1-2 h avant la provocation du frai. Une autre méthode utile consiste à siphonner 20-30 % de l'eau d'expédition toutes les 1-2 h et à la remplacer par de l'eau témoin/de dilution jusqu'à ce qu'au moins 3 remplacements aient été effectués.

2.3.7 pH

Le pH de l'eau de maintien des adultes devrait normalement être de $8,0 \pm 0,2$ et ne doit pas être inférieur à 7,5 ni supérieur à 8,5¹¹. L'eau de mer, dont le pH moyen est de 8,1 (Thurman, 1975), possède un pouvoir tampon considérable. Dans les eaux côtières marines, la salinité est toutefois moins élevée qu'en pleine mer et varie en fonction des eaux de ruissellement. Le pH de l'eau de mer non contaminée se situe normalement entre 7,5 et 8,5, qu'elle soit diluée ou à sa concentration maximale, mais atteint rarement ces valeurs extrêmes. Dans les méthodes actuelles d'essai de toxicité avec des échinides, aucune recommandation n'est formulée quant au pH de l'eau utilisée pour le maintien des adultes (v. annexe D). La plupart des laboratoires ayant répondu au questionnaire (v. 1.1) ont indiqué que la plage de pH précisée ici ne posait pas de problème en regard du maintien, de l'acclimatation ou du frai des espèces d'échinide mentionnées dans la présente méthode d'essai biologique. On a toutefois signalé que l'oursin violet du Pacifique s'acclimatait difficilement à des eaux à pH >8,1 et que des taux de mortalité élevés pourraient être observés si les adultes devaient être maintenus à un pH de cette valeur pendant plus de quelques jours (Carr, Nipper et Biedenbach, comm. pers., 2008).

2.3.8 Alimentation

Il n'est pas nécessaire de nourrir les échinides adultes dont le frai sera provoqué aux fins des essais dans les 3 jours suivant leur arrivée au laboratoire.

Les oursins globuleux maintenus en laboratoire pendant une période prolongée (>3 jours) devraient être nourris de varech ou de macroalgues (*Laminaria*, *Nereocystis*, *Macrocystis*, *Egrecia*, *Hedophyllum*), ou encore de laitue romaine. Au cours d'une enquête récente (v. 1.1), des laboratoires du Canada et des États-Unis ont fait part de leur expérience

quant à l'influence du régime alimentaire sur la survie, la santé et le succès du frai des adultes. La plupart des laboratoires ont nourri les oursins globuleux de légumes-feuilles (laitue romaine, épinards) et de macroalgues, auxquels ils ont ajouté des carottes et/ou des boulettes d'algues. Un laboratoire a souligné que l'état nutritionnel des adultes peut influencer sur la sensibilité de leurs gamètes aux contaminants et que la laitue romaine, à elle seule, n'apportait pas une nutrition appropriée. Les chercheurs de ce laboratoire ont constaté que la laitue romaine à laquelle ils ont ajouté des épinards et des carottes suscitait une meilleure réaction (Carr, Nipper et Biedenbach, comm. pers., 2008). Dans une autre réponse à l'enquête, on a indiqué que les carottes étaient un élément essentiel du régime alimentaire des organismes d'essai et qu'elles avaient permis de maintenir les adultes pendant longtemps, tout en assurant la viabilité des gamètes (Agius, comm. pers., 2008).

L'ajout de nourriture devrait être assez fréquent (chaque semaine ou chaque jour) pour que les oursins puissent toujours se nourrir à volonté; il convient de retirer les vieux aliments ou ceux qui sont décomposés. Un régime alimentaire restreint serait susceptible de réduire le temps de maintien des animaux en bon état de frai (Bay et Greenstein, comm. pers., 2008). On a pu maintenir des oursins globuleux en laboratoire pendant des années en les nourrissant de macroalgues. Le fucus a été à la fois recommandé (EVS, 1989) et déconseillé (Dinnel et coll., 1987). Le fucus et d'autres algues brunes, comme *Alaria esculenta*, jouent un rôle important dans l'alimentation de l'oursin vert de Terre-Neuve (Himmelman et Steele, 1971). Au moment de déterminer s'il est préférable de choisir le fucus ou un autre type d'aliment, le responsable de l'essai devrait se laisser guider par les préférences apparentes des animaux.

Les oursins plats se nourrissent généralement de façon sélective des particules qui gisent au fond de l'eau, de même que de différents déchets organiques, dont les microalgues. C'est pourquoi un sédiment naturel non contaminé

¹¹ Des données sur l'aquaculture portent à croire qu'un pH <7,9 pourrait être stressant pour les espèces marines en général (Bay et Greenstein, comm. pers., 2008).

déposé au fond des réservoirs de maintien des oursins plats devrait contenir de tels déchets et, surtout, des dépôts de plancton. Selon certains, les oursins plats tirent leur subsistance de microalgues, comme les diatomées, qui croissent à la surface des particules sédimentaires; un éclairage propice à la croissance de ces algues sur les sédiments peut donc favoriser le maintien à long terme des animaux. On peut également ajouter des algues de culture ou de la pâte d'algue, au besoin (ASTM, 1990).

Il existe d'autres façons pratiques de nourrir les oursins plats. Ainsi, on pourrait ajouter de la zostère marine déchiquetée (*Zostera* sp.) ou même des épinards, une fois par semaine, pour que les animaux puissent se nourrir des détritiques de ces plantes (EVS, 1989). Les aliments en flocons pour poissons peuvent être utilisés comme supplément (NCASI, 1991). On devrait toutefois éviter de laisser des aliments en décomposition dans les réservoirs.

2.3.9 Nettoyage des réservoirs

Il faudrait brosser et rincer les réservoirs avant d'y déposer un nouveau lot d'adultes. On peut aussi utiliser des désinfectants si on désire réduire les risques de transmission de maladies. Les désinfectants qui contiennent des composés chlorés ou iodophores, ou encore du chlorure de n-alkyl diméthyl benzyl ammonium (p. ex., Comet^{MC}, Ovidine^{MC}, Argentyne^{MC}, Roccal^{MC}), conviennent à cet usage. Les désinfectants sont toxiques pour les organismes aquatiques, et même une infime quantité pourrait se disperser dans le réservoir et se révéler nocive pour les échinides. Après désinfection, on doit rincer abondamment chaque réservoir avec l'eau utilisée pour le maintien des organismes.

Les réservoirs de maintien des adultes devraient toujours être raisonnablement propres. Chaque jour ou selon les besoins, on devrait éliminer les macroalgues qui n'ont pas été consommées. On peut nettoyer périodiquement les réservoirs d'oursins globuleux à l'aide d'un siphon; on peut faire de même pour les récipients d'oursins plats afin d'éliminer les déchets en suspension

et les matières fécales ou encore de remplacer les sédiments. Par ailleurs, on pourrait laisser des morceaux de tests dans les réservoirs des oursins globuleux, car, lorsqu'ils sont en bonne santé, ces animaux ont l'habitude de se couvrir de ces fragments.

2.3.10 Maladie et mortalité

La mortalité des adultes devrait être peu élevée si les organismes sont acclimatés adéquatement aux conditions de laboratoire. À l'occasion, des mortalités surviennent dans la première ou la deuxième semaine suivant l'arrivée des adultes ou lorsque les gonades des adultes reçus sont très mûres et qu'il y a un frai spontané. Des laboratoires ont également signalé une mortalité accrue après avoir provoqué le frai d'organismes prélevés tard dans la période de frai (à compter de septembre pour le clypéastre excentrique et à compter d'avril pour l'oursin violet du Pacifique). De plus, certaines espèces et/ou certains lots d'organismes affichent un taux élevé de mortalité après le frai.

On devrait examiner les adultes dès leur arrivée au laboratoire, puis quotidiennement par la suite, afin de détecter les signes de maladie; les organismes morts devraient être éliminés immédiatement. Le taux de mortalité dans les groupes d'animaux maintenus pendant une période prolongée (>3 jours) avant la collecte des gamètes aux fins de l'essai ne devrait pas dépasser 2 % par jour en moyenne pendant les 7 jours précédant cette collecte. Le taux de mortalité cumulé pendant ces 7 jours ne doit pas dépasser 20 %. Si des organismes d'un lot donné meurent après la provocation du frai aux fins de l'essai, ils peuvent être exclus du calcul de la mortalité quotidienne ou hebdomadaire. On peut séparer du reste du lot les adultes dont on a provoqué le frai en vue de l'essai et les exclure du calcul de la mortalité, à moins qu'ils ne servent pour d'autres essais.

Dans le cas des adultes dont le frai sera provoqué dans les 3 jours suivant leur arrivée au laboratoire, il faudrait obtenir du fournisseur des données sur le taux de mortalité cumulé pendant les 7 jours précédant l'expédition, et celui-ci ne

devrait pas dépasser 20 %. Si ce taux est supérieur à 20 %, aucun adulte du lot ne doit servir à la collecte des gamètes la journée même de son arrivée au laboratoire. Ce même critère s'applique lorsque les adultes sont maintenus pour une brève période (≤ 3 jours) avant la provocation du frai. En d'autres termes, le taux de mortalité cumulé à l'arrivée et pendant les 3 jours précédant la provocation du frai doit être de < 20 %.

Quant aux groupes d'adultes dont le taux de mortalité est élevé (c.-à-d. supérieur à l'un ou l'autre des critères précisés ici), les échinides survivants devraient être soit éliminés, soit maintenus jusqu'à ce que le taux de mortalité soit acceptable.

Il faut également se débarrasser des animaux moribonds, des oursins globuleux qui présentent une perte importante de piquants et des oursins plats qui portent des plaques de champignons. On reconnaît généralement les oursins globuleux moribonds à l'absence d'activité des pieds ambulacraires, à leur incapacité à se

retourner lorsqu'on les place sur le dos et, en particulier, à l'absence d'adhérence au substrat.

Dans le cas des oursins plats, les signes d'agonie se manifestent habituellement dans leur aspect extérieur et leur niveau d'activité : lorsque l'épiderme se désintègre, tout le test affiche une décoloration ou des taches claires et les animaux cessent de se recouvrir de sédiments. De plus, seul un examen attentif (à la loupe ou au microscope à dissection) permet de détecter la faible activité des pieds ambulacraires combinée à un amollissement des piquants et des pédicellaires (petits appendices en forme de pince situés parmi les pieds ambulacraires). Le test des oursins plats morts se couvre d'une couche visqueuse et tend à noircir.

On ne devrait pas tenter de traiter les adultes malades avec des produits chimiques; il est fortement recommandé de se départir des groupes d'animaux qui présentent un taux de morbidité élevé.

Système d'essai

3.1 Installations et appareils

Les essais doivent être réalisés dans des installations situées à l'écart des activités normales du laboratoire. Si on ne dispose pas d'une pièce isolée, on devrait empêcher la poussière et les émanations de pénétrer dans la zone d'essai.

Les matériaux de construction et toute pièce d'équipement qui risquent d'entrer en contact avec les solutions d'essai ou avec l'eau témoin/de dilution ne devraient contenir aucune substance susceptible de passer dans les solutions ou d'accroître la sorption de la substance ou de la matière d'essai (v. 2.3.2). Le laboratoire doit être doté des instruments nécessaires à la mesure des variables fondamentales de la qualité de l'eau (température, *salinité/conductivité*, OD et *pH*) et doit être prêt à analyser rapidement et précisément d'autres variables, comme la teneur en ammoniac.

La température de toutes les solutions d'essai ne devrait pas s'écarter de plus de 1 °C de la température souhaitée. Pour maintenir cette température, on peut utiliser divers appareils, comme un bain d'eau à température contrôlée dans lequel on immerge les récipients d'essai.

3.2 Éclairage

L'éclairage normal du laboratoire suffit pour les essais.

3.3 Récipients d'essai

Au départ, on peut choisir d'utiliser 10 mL, 5 mL ou 2 mL de solution d'essai; il faut donc prévoir des récipients dont la capacité correspond au volume choisi. Ces volumes sont représentatifs de la gamme généralement utilisée dans les méthodes publiées (annexe D).

Un volume de 10 mL de solution est considéré comme caractéristique, les plus petits volumes étant réservés à des usages spéciaux (v. introduction de la section 4).

Il faut utiliser comme récipients d'essai des flacons ou des éprouvettes en verre borosilicaté. On recommande de se servir de récipients d'une capacité de 20 mL pour les solutions d'essai de 10 mL, ce qui correspond d'ailleurs à la pratique courante (annexe D, tableau 8). Pour les plus petits volumes de solution, on recommande d'utiliser des récipients dont la capacité correspond environ au double du volume de solution utilisé, par exemple des récipients de 5 mL pour 2 mL de solution. On peut toutefois utiliser de plus grands flacons si on le désire; ainsi, on place parfois 2 mL de solution dans des flacons d'une capacité allant jusqu'à 13 mL (annexe D). Il est préférable qu'un laboratoire utilise systématiquement des récipients de volume uniforme¹².

Les récipients d'essai devraient être munis d'un bouchon ou de toute autre sorte de dispositif de fermeture afin de prévenir les risques de contamination des solutions par l'air ambiant et la perte de composés volatils. On pourrait se servir d'une pellicule plastique pour couvrir tous les récipients d'essai. Ces derniers devraient être à usage unique, neufs et n'avoir jamais été lavés. Il est également possible de réutiliser des éprouvettes à condition de les laver et de les rincer à fond avant usage; cette

¹² En entraînant une modification de la profondeur relative, de la surface relative du liquide et d'autres paramètres, les variations de la taille des récipients peuvent avoir, sur les résultats d'essai, une influence encore inexplicitée. Au moment de la publication du présent document, il ne semblait pas y avoir de consensus sur la taille exacte des récipients à utiliser. Si on en arrivait à un tel consensus, les responsables des essais devraient s'y conformer de façon à réduire au minimum les effets potentiels associés à la taille et aux proportions des récipients.

méthode n'est toutefois pas recommandée, car il semble qu'elle donne lieu à une toxicité mesurable¹³.

Les laboratoires ont beaucoup de latitude quant au choix du type et de la forme des récipients d'essai. Toutefois, pour un essai donné, on doit se servir de récipients de type, de taille et de forme identiques pour chaque *traitement*. On ne doit pas utiliser de récipients en plastique, car il a été démontré qu'ils avaient des effets néfastes sur le succès de la fécondation (Dinnel et coll., 1987). Les récipients utilisés dans les méthodes mentionnées à l'annexe D sont pour la plupart à usage unique, munis de bouchons et en verre borosilicaté (p. ex., en Pyrex^{MC}). On les appelle *flacons à scintillation*, *éprouvettes de culture*, *éprouvettes d'essai* ou simplement *éprouvettes* ou *flacons*; ces types de récipients semblent appropriés dans la mesure où leur capacité convient aux essais.

3.4 Eau témoin/de dilution

Selon la substance ou la matière d'essai utilisée et les objectifs de l'essai (sections 5 à 8), on peut se servir d'eau de mer naturelle non contaminée, d'eau de mer reconstituée (artificielle) ou d'un échantillon d'eau réceptrice prélevé en amont de la source de contamination comme eau témoin/de dilution.

¹³ Dinnel et coll. (1987) ont évalué les modes de préparation de différents types de flacons. La fécondation s'est révélée excellente dans les éprouvettes en verre borosilicaté non lavées, alors qu'aucune fécondation ne s'est produite dans les éprouvettes en verre lavées à l'acide et rincées (ce qui indique une toxicité très élevée). On a observé un taux de fécondation très bas dans les éprouvettes non lavées en polystyrène et en polyéthylène, et légèrement supérieur dans les éprouvettes en plastique lavées, bien que ces dernières donnent un rendement satisfaisant pour la culture de tissus, par exemple. Certains laboratoires ont observé une toxicité sporadique dans quelques lots d'éprouvettes neuves et non lavées, mais la plupart des lots ne montraient aucun signe de toxicité.

On peut porter l'eau de mer artificielle à la salinité voulue par ajout, à l'*eau désionisée*, d'une quantité appropriée de sels de mer secs du commerce (p. ex., Instant Ocean^{MC}, Red Sea Salt^{MC}), de sels de qualité réactif (p. ex., GP2 modifié; v. Bidwell et Spotte, 1985, ou le tableau 2 dans USEPA, 1994 ou 1995) ou de SHS naturelle ou artificielle (conformément aux indications fournies en 2.3.4 dans EC, 2001). Si la salinité de l'eau de mer naturelle non contaminée utilisée pour l'essai est trop faible ou trop élevée (c.-à-d. <28 g/kg ou >32 g/kg), on peut la mélanger avec une quantité appropriée de sels de mer secs, de sels de qualité réactif ou de SHS naturelle ou artificielle, ou encore avec un volume suffisant d'eau désionisée pour ajuster la salinité à l'intérieur de la plage prévue pour l'essai. Si l'eau de mer naturelle ou artificielle devant servir d'*eau de dilution* doit être entreposée pendant plus d'une journée, on devrait la réfrigérer (à 4 ± 2 °C) pour réduire au minimum la prolifération microbienne (EC, 2001). Si on utilise de l'eau réceptrice, les conditions de prélèvement, de transport et d'entreposage devraient être conformes aux indications fournies en 6.1. L'eau témoin/de dilution utilisée pour un essai donné doit provenir de la même source (s'il s'agit d'eau de mer naturelle) ou du même lot (s'il s'agit d'eau de mer reconstituée); on ne devrait pas utiliser l'eau de mer artificielle plus de 14 jours après sa préparation (EC, 2001). Toutes les eaux marines, y compris les réserves d'eau de mer naturelle du laboratoire, utilisées comme eau témoin/de dilution devraient être passées à travers un filtre à pores de ~ 60 μm (USEPA, 1994).

La salinité de l'eau témoin/de dilution devrait être de 30 g/kg et ne doit pas être inférieure à 28 g/kg ni supérieure à 32 g/kg. On devrait augmenter la salinité par ajout de SHS vieillie dont la salinité est de 90 ± 1 g/kg (v. 2.3.4) ou

la réduire par ajout d'eau désionisée, d'eau distillée ou d'eau douce non contaminée¹⁴.

Le pH de l'eau témoin/de dilution doit se situer entre 7,5 et 8,5 (normalement, $8,0 \pm 0,2$). Ces valeurs sont généralement recommandées en raison du pouvoir tampon naturel de l'eau de mer. Au besoin, on devrait utiliser un acide ou une base (v. 4.3.4) pour obtenir ces valeurs.

On doit amener l'eau témoin/de dilution à la température de l'essai avant de l'utiliser. Elle ne devrait pas être sursaturée en gaz (v. 2.3.4) et doit avoir une teneur en OD de 90-100 % de la valeur de saturation en air. Au besoin, l'aérer vigoureusement à l'aide d'un jet d'air comprimé exempt d'huile passant à travers des pierres de barbotage.

¹⁴ Il est possible que les gamètes de certaines espèces ou de toutes les espèces d'essai tolèrent des salinités hors de la plage recommandée (v. 4.3.2 et la note en bas de page correspondante), en particulier des salinités plus élevées se rapprochant de la salinité moyenne des océans, soit ~ 35 g/kg. En fait, il est probable que des salinités de $\sim 34-35$ g/kg soient moins dommageables que des salinités de $\sim 28-30$ g/kg. Les plages de salinité recommandées dans le présent document ont été établies en fonction de la salinité naturelle des océans et des valeurs ayant donné de bons résultats dans l'application des méthodes d'essai avec des échinides, c'est-à-dire qui se situent, pour la plupart, à ~ 30 g/kg (annexe D).

Méthodes d'essai universelles

Les méthodes décrites dans la présente section s'appliquent à tous les essais sur les substances chimiques, eaux usées et eaux réceptrices décrits aux sections 5, 6 et 7, de même que sur les échantillons liquides extraits d'un sédiment (c.-à-d. eau de porosité) ou d'une matière solide semblable décrits à la section 8. Tous les éléments du système d'essai décrit à la section 3 doivent être incorporés dans ces méthodes d'essai universelles. La liste de contrôle (v. tableau 3) dans laquelle sont résumés les conditions et modes opératoires recommandés comprend non seulement les méthodes universelles, mais aussi celles qui conviennent à des substances ou matières d'essai particulières.

Les méthodes d'essai générales proposées ici comportent certaines variantes, dont 3 durées d'exposition. Dans le premier cas, du sperme est d'abord exposé pendant 10 min, puis pendant 10 autres minutes après ajout des œufs. Cette durée d'exposition type est généralement recommandée. Elle réduirait au minimum le vieillissement des *gamètes* pendant un essai ou une série d'essais. Une courte période d'exposition conviendrait parfaitement aux programmes d'envergure comportant de nombreux essais visant, par exemple, l'identification des composés toxiques d'un effluent complexe (programmes d'IET). Elle permettrait de procéder à des manipulations successives de l'effluent avant que celui-ci ait vieilli de façon notable.

Dans une deuxième variante, du sperme est d'abord exposé pendant 20 min, puis pendant 20 autres minutes après ajout des œufs. Cette option peut être retenue lorsqu'on souhaite comparer des résultats ou des méthodes d'essai (annexe D). La troisième variante prévoit la période d'exposition la plus longue, soit 60 min pour le sperme, plus 20 min pour le sperme et les œufs; elle convient aux essais qui nécessitent une sensibilité maximale. Elle entraîne toutefois

une augmentation de la variabilité des résultats (v. 4.2.4).

On peut également choisir entre 3 volumes de solution d'essai : 10 mL, 5 mL ou 2 mL de chacune des concentrations de l'échantillon. Au Canada, les responsables d'essai utilisent généralement un volume type de 10 mL. Ce volume plus élevé devrait faciliter les manipulations et pourrait permettre d'obtenir un degré de précision relativement plus élevé que de petits volumes. Les essais réalisés avec de petits volumes nécessitent toutefois un moins grand nombre d'adultes pour la production des gamètes, de même qu'un bain-marie ou une enceinte à température constante moins grands. De petits volumes peuvent convenir à certaines études, comme les essais sur les effluents d'usines pilotes, notamment dans le cadre d'un programme d'IET.

4.1 Préparation des solutions d'essai

On doit nettoyer et rincer à fond tous les récipients, appareils de mesure, dispositifs d'agitation et seaux utilisés pour transférer les organismes, conformément aux méthodes normalisées. Il faudrait utiliser de l'eau témoin/de dilution pour le dernier rinçage de tous les éléments devant servir immédiatement à l'essai. On devrait utiliser de l'eau distillée ou désionisée pour le dernier rinçage des instruments destinés à être entreposés après le séchage.

4.1.1 Eau témoin/de dilution

La même eau témoin/de dilution doit servir à la préparation du témoin et de toutes les concentrations d'essai. Il faut mélanger toutes les solutions d'essai avec une tige en verre, un agitateur en Téflon^{MC} ou tout autre instrument fait d'un matériau non toxique. Avant de procéder à l'essai, la température de l'eau témoin/de dilution et de l'échantillon ou de

Tableau 3. Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour les essais

Méthodes universelles	
Type d'essai	– <i>sans renouvellement</i> ; exposition type du sperme pendant 10 min, suivie d'une exposition du sperme et des œufs pendant 10 autres minutes aux fins de la fécondation; autres durées d'exposition : 20 + 20 min ou 60 + 20 min
Eau témoin/ de dilution	– eau de mer non contaminée du laboratoire, filtrée (pores de 60 µm); eau de mer reconstituée (artificielle); eau réceptrice d'« amont filtrée » (pores de 60 µm) pour évaluer l'effet toxique à un endroit particulier et eau de mer du laboratoire pour le témoin; teneur en OD : 90-100 % de saturation au moment de l'utilisation; salinité : 28-32 g/kg, de préférence 30 g/kg; pH : 7,5-8,5, de préférence 8,0 ± 0,2
Organismes	– ~2 000, 1 000 ou 400 œufs par <i>réceptacle d'essai de répétition</i> , selon le volume choisi pour les solutions d'essai; le rapport spermatozoïdes:œufs déterminé dans un prétest doit permettre un taux de fécondation optimal de 80 % dans des conditions contrôlées
Nombre de concentrations	– ≥7, plus le ou les témoins; un nombre plus élevé est recommandé (≥10), plus le ou les témoins
Répétitions	– ≥3 par <i>traitement</i> pour le calcul de la CI_p ; ≥4 par <i>traitement</i> pour les essais à concentration unique (p. ex., concentration maximale) aux fins du test d'hypothèse
Récipients pour les solutions	– volume type de 10 mL de solution d'essai ou, autrement, de 5 mL ou de 2 mL; récipients en verre borosilicaté munis de bouchons ou de couvercles
Température	– 15 °C pour les espèces indigènes (oursin vert, oursin violet du Pacifique, clypéastre excentrique); 20 °C pour l'oursin violet de l'Atlantique et l'oursin blanc; pour chaque récipient, écart maximal de ± 1 °C de la température souhaitée
Salinité	– salinité normale d'essai de 30 g/kg (plage de 28-32 g/kg); la salinité de chaque solution d'essai doit se situer dans cette plage et ne pas s'éloigner de plus de 1 g/kg par rapport à la salinité du témoin; ajuster au besoin la salinité de l'échantillon ou des solutions d'essai avec de la SHS dont la salinité est de 90 ± 1 g/kg, des sels de mer secs du commerce, des sels de qualité réactif ou, si la salinité est de >32 g/kg, de l'eau désionisée; ajuster au besoin la salinité de l'eau témoin/de dilution avec de la SHS dont la salinité est de 90 ± 1 g/kg ou avec des sels secs; si de la SHS a été ajoutée à l'échantillon ou aux solutions d'essai et si l'eau témoin/de dilution diffère d'une façon quelconque, il faut prévoir une deuxième série de témoins dont la salinité est ajustée à 30 ± 2 g/kg et préparée en ajoutant, à de l'eau désionisée, de la SHS vieillie (90 ± 1 g/kg) ou des sels secs
Oxygène dissous/aération	– aucune préaération des aliquotes de l'échantillon (p. ex., un effluent) ou de la solution d'essai, sauf si la teneur en OD estimée est de <40 % ou de >100 % de saturation, auquel cas il faut aérer une aliquote de l'échantillon pendant ≤20 min, à raison de ≤100 bulles/min, au moyen d'un tube en verre ou en plastique à petite ouverture (p. ex., 0,5 mm de diamètre intérieur), avant de préparer les concentrations d'essai et de commencer l'essai; aucune aération au cours de l'essai

pH	– normalement, les essais à des fins réglementaires ou de surveillance ne nécessitent pas un ajustement du pH de l'échantillon ou de la solution; pour d'autres types d'essai, il pourrait être nécessaire ou indiqué d'ajuster le pH ou de réaliser un deuxième essai (avec pH ajusté); un pH se situant entre 7,5 et 8,5, de préférence $8,0 \pm 0,2$, permet de réduire au minimum les effets directs du pH sur les gamètes et augmente au maximum la sensibilité de l'essai pour la détection de toxiques
Éclairage	– éclairage normal du laboratoire ou lumière du soleil; photopériode variable
Observations	– pourcentage d'œufs fécondés parmi 100 ou 200 œufs prélevés dans chaque récipient et examinés au microscope
Mesures	– température, salinité, pH et OD au début de l'exposition, pour toutes les aliquotes de solutions d'essai de concentration élevée, moyenne ou faible et pour le témoin
Paramètres	– dans les essais à concentrations multiples, CI_p pour le succès de la fécondation; dans les essais à concentration unique, pourcentage de fécondation et comparaison avec le témoin; dans les essais sur l'eau de porosité, pourcentage de fécondation et comparaison avec le témoin ou l'eau de porosité de référence de chaque traitement (c.-à-d. pour chaque dilution de l'eau de porosité)
Toxique de référence	– on recommande le cuivre; établir la CI_p du succès de la fécondation, dans les 14 jours précédant l'essai définitif ou en même temps que ce dernier, pour chaque nouveau <i>lot</i> d'adultes si ceux-ci sont maintenus pendant ≤ 3 jours
Validité de l'essai	– le taux de fécondation moyen chez les organismes témoins doit être de ≥ 60 % et de < 98 %

Substances chimiques

Solvants	– à utiliser uniquement dans des cas particuliers; concentration maximale de 0,1 mL/L
Concentration	– on recommande d'effectuer des mesures au début de l'essai, dans les aliquotes des concentrations faible, moyenne et élevée ainsi que dans le ou les témoins
Eau témoin/ de dilution	– selon les indications et/ou les objectifs : eau de mer reconstituée si on souhaite un degré élevé de normalisation, eau réceptrice si on se préoccupe de l'incidence d'un toxique à l'échelle locale, eau de mer non contaminée du laboratoire dans tous les autres cas

Effluents, lixiviats et éluutriats

Volume de l'échantillon	– 2 L devraient suffire à l'essai et aux analyses chimiques habituelles
Transport et entreposage	– au moment du prélèvement, la température des échantillons tièdes (> 7 °C) doit être abaissée à 1-7 °C avec de la glace hydrique (et non de la glace sèche) ou des sacs réfrigérants; pendant le transport, garder les échantillons dans l'obscurité et maintenir la température à 1-7 °C (de préférence 4 ± 2 °C) au moyen de sacs réfrigérants au besoin; les échantillons ne doivent pas geler pendant le transport ou l'entreposage; les entreposer dans l'obscurité à 4 ± 2 °C; les essais devraient commencer dans les 24 h ou, obligatoirement, dans les 3 jours suivant le prélèvement des échantillons ou l'extraction des éluutriats; l'extraction du liquide des sédiments devrait être réalisée dans les 2 semaines ou, obligatoirement, dans les 6 semaines suivant le prélèvement

- Eau témoin/
de dilution – selon les indications et/ou les objectifs de l'essai; eau de mer du laboratoire ou eau réceptrice d'« amont » pour les essais de *surveillance* et de vérification de la *conformité*
- Solides
en suspension – normalement, aucune filtration n'est requise; filtrer l'effluent ou le lixiviat à travers un tamis à pores de 60 µm si l'échantillon contient des débris ou des organismes indigènes qui pourraient être confondus avec les gamètes ou s'attaquer aux gamètes ou aux œufs fécondés; centrifuger l'élutriat

Eaux réceptrices

- Volume
de l'échantillon – comme pour les effluents, les lixiviats et les élutriats
- Transport
et entreposage – comme pour les effluents, les lixiviats et les élutriats
- Eau témoin/
de dilution – selon les indications et/ou les objectifs de l'essai; pour étudier l'incidence d'un toxique à l'échelle locale, utiliser de l'eau réceptrice d'« amont »

Sédiments et solides semblables

- Transport
et entreposage – même température que pour les effluents et les lixiviats; l'essai devrait commencer dans les 2 semaines ou, obligatoirement, dans les 6 semaines suivant le prélèvement
- Préparation
et essai – les échantillons aqueux extraits d'un sédiment devraient être traités comme les effluents, les lixiviats et les élutriats; il faudrait équilibrer la teneur en solvant des extraits à base de solvant; cet essai ne convient pas aux solides
- Sédiment
de référence – essai parallèle sur des sédiments non contaminés aux propriétés physicochimiques similaires à celles du sédiment d'essai, si possible; autrement, tout sédiment non contaminé (témoin)
- Eau témoin/
de dilution – comme pour les effluents, les lixiviats et les élutriats

chaque solution d'essai doit être ajustée au besoin à ± 1 °C de la température recommandée pour l'essai. Il ne faut pas utiliser de thermoplongeur pour réchauffer les échantillons ou les solutions d'essai, car cela pourrait en altérer les composants chimiques et la toxicité. Il faudra peut-être ajuster la salinité ou le pH de l'échantillon de la substance d'essai ou des solutions d'essai (v. 4.3.2 et 4.3.4) ou procéder à une préaération (v. 4.3.3).

L'eau témoin/de dilution peut provenir de la source d'approvisionnement direct du laboratoire en eau de mer naturelle non contaminée, de l'eau « d'amont » (c.-à-d. des eaux réceptrices)

prélevée à un endroit précis à l'étude, ou de l'eau de mer reconstituée (artificielle) (v. 2.3.4 et 3.4). On peut, au besoin, porter l'eau de mer à la salinité voulue (30 ± 2 g/kg) par ajout de sels de mer secs du commerce (p. ex., Instant Ocean^{MC}, Red Sea Salt^{MC}), de sels de qualité réactif (p. ex., GP2 modifié; v. Bidwell et Spotte, 1985, ou le tableau 2 dans USEPA, 1994 ou 1995) ou de SHS naturelle ou artificielle, ou encore par ajout d'eau désionisée. La SHS, les sels de mer secs ou les sels de qualité réactif doivent provenir de la même source que ceux utilisés pour ajuster la salinité de l'échantillon d'essai ou des solutions d'essai (v. 5.2 et 6.2).

Si la salinité de l'échantillon/des solutions d'essai est ajustée avec de la SHS, l'essai toxicologique doit inclure une série de témoins (*témoins de la SHS*) préparés uniquement avec cette SHS et de l'eau désionisée et ajustés à la salinité d'essai (30 ± 2 g/kg). De même, si on ajoute des sels de mer secs du commerce ou des sels de qualité réactif à l'échantillon ou aux solutions d'essai, l'essai toxicologique doit inclure une série de témoins (*témoins des sels*) préparés avec des sels secs provenant de la même source et du même lot et ayant la même concentration que ceux ajoutés à l'échantillon d'essai. Il faut prévoir une deuxième série de témoins (*témoins de l'eau de dilution*), constitués uniquement d'eau de dilution, si l'eau utilisée pour diluer l'échantillon diffère d'une façon ou d'une autre des *témoins de la SHS* ou des *témoins des sels* (p. ex., eau de mer naturelle avec ou sans SHS ou sels secs ajoutés, ou eau douce naturelle avec SHS ou sels secs ajoutés) (v. 4.1.4).

Si on doit entreposer de l'eau de mer naturelle, on devrait la conserver à une température égale ou inférieure à la température d'essai et l'utiliser dans un délai de ≤ 3 jours.

Les portions d'eau de mer (c.-à-d. l'eau témoin/de dilution ou l'eau de porosité témoin/de référence) servant à déterminer la densité du sperme (v. 4.2.2) et le rapport spermatozoïdes:œufs qui convient à l'essai (v. 4.2.3) devraient être filtrées pour éliminer les solides pouvant interférer avec la numération spermatique. La filtration est particulièrement importante si on utilise de l'eau de mer naturelle. On recommande d'utiliser à cette fin un filtre à pores de ~ 60 μm (USEPA, 1994). L'eau filtrée devrait être utilisée dans un délai de ≤ 3 jours.

On utilise parfois de l'eau réceptrice comme eau témoin/de dilution afin de simuler certaines conditions locales, comme le rejet d'effluents, le déversement de substances chimiques ou la pulvérisation de pesticides. Dans ce cas, on doit préparer un deuxième témoin à partir de l'eau de mer du laboratoire dans laquelle on a

maintenu les adultes (v. 4.1.4). Il ne faut toutefois pas utiliser d'eau réceptrice d'« amont » si elle est manifestement toxique et si les résultats obtenus avec le témoin ne sont pas valides, selon les critères qui régissent cet essai sur la fécondation¹⁵. Le cas échéant, on devrait utiliser comme eau témoin/de dilution l'eau de mer reconstituée (v. 2.3.4) ou l'eau de mer naturelle du laboratoire. On pourrait également utiliser l'eau du laboratoire s'il est impossible de prélever et d'utiliser de l'eau réceptrice¹⁶.

4.1.2 Concentrations

Dans tout essai visant à évaluer la CI_p par analyse de régression (v. 4.5.2), on doit préparer au moins 7 concentrations d'essai et 1 solution témoin (constituée uniquement d'eau témoin/de dilution); un plus grand nombre de *traitements* (≥ 10 , plus un témoin) est toutefois recommandé. On peut utiliser une série de dilutions géométriques dans laquelle chaque concentration de la solution d'essai équivaut à environ la moitié de la

¹⁵ De faibles concentrations de contaminants déjà présentes dans l'eau réceptrice peuvent exacerber la toxicité de la substance ou de la matière d'essai, mais sans avoir une incidence directe sur les témoins. En pareil cas, de l'eau de dilution non contaminée (eau de mer reconstituée ou naturelle) permettrait d'évaluer avec une plus grande précision la toxicité de la substance ou de la matière d'essai, mais entraînerait presque à coup sûr une sous-estimation des répercussions réelles sur le site à l'étude.

Si l'objectif de l'essai consiste à déterminer l'effet d'une substance ou matière particulière sur une eau réceptrice donnée, il importe peu que les substances toxiques présentes dans l'eau réceptrice modifient la toxicité des échantillons ou que d'autres substances, comme les acides humiques, réduisent les effets toxiques. Lorsque l'eau réceptrice ajoute à la toxicité des échantillons, il conviendrait d'utiliser au moins un autre témoin constitué d'eau de mer du laboratoire ou d'eau de mer reconstituée et, au plus, une deuxième série de concentrations de la substance diluée avec cette eau.

¹⁶ On pourrait préparer une solution simulant en partie l'eau réceptrice en ajustant la salinité (et peut-être le pH) de l'eau de mer du laboratoire ou de l'eau de mer reconstituée. Selon la situation, on peut amener ces paramètres à des niveaux correspondant à des valeurs ou moyennes saisonnières données. On peut procéder aux ajustements selon les méthodes indiquées en 2.3.4.

précédente (p. ex., 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,1, 1,6, etc.). On peut également choisir des concentrations d'essai dans d'autres séries de dilution (p. ex., 100, 75, 56, 42, 32, 24, 18, 13, 10, 7,5; v. annexe F, colonne 7). Il n'est pas conseillé d'utiliser un coefficient de dilution aussi bas que 0,3 (p. ex., concentrations de 100, 30, 9, etc.) pour les essais courants, car l'estimation de la toxicité serait *peu précise*; toutefois, on peut utiliser un tel coefficient si une grande incertitude entoure la plage des concentrations susceptibles d'être toxiques.

On prépare d'abord chacune des concentrations et on ajoute aux récipients d'essai de *répétition* le volume choisi (10 mL, 5 mL ou 2 mL). Les concentrations nominales des solutions (ou concentrations mesurées; v. 5.4) sont utilisées comme concentrations d'essai. On ne tient pas compte de la légère diminution de la concentration imputable à l'ajout des aliquotes de sperme en suspension¹⁷. La concentration nominale à laquelle le sperme est exposé est adoptée pour tout l'essai. La concentration diminue de ~9 % dans la dernière partie de l'essai, c'est-à-dire après ajout des œufs en suspension, mais aux fins de la caractérisation de l'essai, on utilise les concentrations initiales auxquelles le sperme a été exposé¹⁸.

¹⁷ Les concentrations auxquelles le sperme est réellement exposé équivaldraient à 99 % des concentrations initiales des solutions d'essai, car on ajoute 0,1 mL de la suspension de sperme à 10 mL de la solution d'essai (cette suspension est proportionnelle aux solutions d'essai). Par exemple, si on évaluait la toxicité d'un effluent non dilué qui contient un récipient, le sperme serait exposé à une concentration correspondant à $10/10,1 \times 100 \% = 99 \%$. Cette légère différence est tenue pour négligeable.

¹⁸ Du moins dans certains cas, le sperme est plus sensible que les œufs, de sorte que la concentration pendant l'exposition initiale du sperme peut être considérée comme le facteur déterminant. Par exemple, un essai sur la fécondation chez les échinides (Cherr et coll., 1987) révèle que les composants toxiques d'un effluent de fabrication de pâte de papier kraft blanchie ont plus d'effets sur le sperme que sur les œufs. Kobayashi (1984) a passé en revue ses propres travaux et ceux d'autres auteurs et a conclu que les gamètes mâles sont souvent l'élément le plus sensible qui détermine le succès de la fécondation et du développement embryonnaire.

Si une grande incertitude entoure la toxicité de l'échantillon, il peut être utile de procéder à un essai de délimitation d'une plage de valeurs ou à un prétest dans le seul but de choisir les concentrations à utiliser pour l'essai définitif. Dans un tel cas, les conditions et modes opératoires n'ont pas à être observés à la lettre. L'utilisation d'une large plage de concentrations (p. ex., de ≥ 2 ordres de grandeur) devrait faciliter le choix des concentrations pour l'essai réel.

On pourrait se servir d'essais à concentration unique à des fins réglementaires (p. ex., pour des essais à résultat unique). Dans ce cas, il faudrait normalement utiliser un effluent, un lixiviat, une eau réceptrice, un éluatriat ou un autre extrait aqueux (eau de porosité) non dilué provenant d'un sédiment ou d'un autre solide semblable, ou une concentration arbitraire ou recommandée d'une substance chimique. L'utilisation de témoins devrait suivre les mêmes règles que pour les essais à concentrations multiples. Le présent document ne décrit pas les essais à concentration unique, mais les modes opératoires sont évidents et tous les conseils donnés ici s'appliquent, sauf que l'essai porte sur une seule concentration et sur un seul témoin.

4.1.3 Répétitions

Dans le cas d'un essai à concentrations multiples comportant par ailleurs la détermination de la CI_p , chaque traitement, y compris le ou les témoins, doit comporter ≥ 3 récipients d'essai de *répétition*, mais un nombre supérieur est recommandé (à savoir 5 récipients). S'il s'agit plutôt d'un essai à concentration unique (ou faisant appel à de multiples solutions à concentration maximale) assorti d'un test d'hypothèses¹⁹, chaque traitement, y compris le ou les témoins, doit

¹⁹ Il convient de souligner que ce test d'hypothèses ne sert pas à déterminer les CSEO et les CMEO et qu'il ne comporte pas de dilutions. Il sert plutôt à déterminer s'il existe des écarts notables entre les solutions d'essai à concentration maximale.

inclure ≥ 4 récipients de répétition²⁰, mais un nombre supérieur est recommandé.

4.1.4 Témoins

Tous les essais exigent une exposition témoin faisant appel à l'eau témoin/de dilution (*témoin de l'eau de dilution*) utilisée pour préparer les concentrations d'essai. Une série distincte de témoins, composés uniquement de SHS ou de sels secs dans de l'eau désionisée dont la salinité est de 30 ± 2 g/kg (v. 2.3.4 et 4.1.1), est requise si de la SHS ou des sels secs sont ajoutés à l'échantillon d'essai ou aux solutions d'essai (v. 4.3.2) et si l'eau de dilution diffère d'une manière quelconque de ce *témoin de la SHS* ou de ce *témoin des sels*. Chaque témoin doit comporter le même nombre de répétitions (≥ 3), comme chacune des autres solutions d'essai. Il faut examiner les résultats obtenus en regard de chaque *témoin de l'eau de dilution*, *témoin de la SHS* ou *témoin des sels* employé dans un essai toxicologique afin de déterminer s'ils sont indépendamment conformes au critère propre à l'essai ou au critère de validité de l'essai (v. 4.5.1). Lorsque 2 séries de solutions témoins sont utilisées (c.-à-d. des *témoins de la SHS* ou *témoins des sels* et *témoins de l'eau de dilution*), les résultats de l'essai toxicologique sont considérés comme valides et acceptables à la condition que chaque série soit indépendamment conforme au critère de validité qui lui est propre (v. EC, 2001 et 2005; v. aussi 4.5.1). Si, et seulement si, les 2 séries de témoins sont conformes au critère de validité de l'essai et que les résultats obtenus pour chacune ne sont statistiquement pas différents d'une série à l'autre, on peut regrouper (au besoin) ces résultats avant le calcul des paramètres statistiques pour chaque série de concentrations d'essai en comparaison des solutions témoins. Il ne faut pas procéder à un tel regroupement

avant de déterminer si les résultats de l'essai sont valides ou non (EC, 2001). Si le test-*t* (EC, 2005) révèle que les résultats obtenus chez les témoins sont statistiquement différents, on ne doit pas regrouper les données – on utilise plutôt les témoins les plus pertinents pour calculer les paramètres statistiques.

Si, pour une raison ou pour une autre, la salinité des solutions d'essai se situe hors de la plage exigée de 28-32 g/kg, on devrait inclure des *témoins de la salinité* dans l'essai. Si des échantillons constitués essentiellement d'eau douce (salinité de ≤ 5 g/kg) ont été soumis à l'essai sans ajustement de la salinité, on devrait préparer des témoins de la salinité en ajoutant, dans les mêmes proportions que pour les liquides d'essai, de l'eau désionisée ou de l'eau distillée à une série de récipients. Ces témoins indiquent l'effet d'une faible salinité, mais non l'exacerbation de l'effet qui résulte de l'interaction entre une faible salinité et les substances ou matières toxiques présentes dans l'échantillon (v. 4.3.2).

Lorsqu'on a recours à un solvant pour l'essai sur une substance chimique très peu soluble, on doit préparer une répétition du « témoin du solvant », et ce témoin doit correspondre à la plus forte de toutes les concentrations utilisées pour l'essai.

Si de l'eau réceptrice est utilisée comme eau témoin/de dilution, on doit préparer une deuxième série de témoins à partir de l'eau de mer (artificielle ou naturelle) du laboratoire servant au maintien des adultes (v. 2.3.4).

D'autres types de témoins ne sont pas exigés, mais il est recommandé d'en prévoir pour mieux juger de la qualité des résultats de l'essai. Un témoin à « faible concentration spermatique », par exemple, ne contiendrait que la moitié du sperme utilisé pour l'essai et permettrait de détecter une surconcentration spermatique, problème courant dans cet essai. Si on obtient un taux de fécondation de >90 % avec le témoin type et que le taux obtenu avec le témoin à faible concentration spermatique n'est pas

²⁰ Les exigences touchant les répétitions sont généralement modelées sur celles précisées dans d'autres méthodes ayant fait l'objet d'un examen (v. annexe D). Cinq de ces méthodes recommandent « ≥ 3 répétitions », certaines soulignant que 4 seraient exigées pour les statistiques non paramétriques. Cinq autres méthodes ne renferment aucune précision quant aux répétitions.

inférieur de 5 % à cette valeur, cela signifie qu'il y a surconcentration spermatique, laquelle est associée à une sensibilité médiocre de l'essai. Un « témoin toxique-œufs » contient une forte concentration du toxique, mais pas de sperme; il permet de déterminer si l'échantillon soumis à l'essai entraîne la formation de fausses membranes de fécondation. Un « témoin à blanc » contenant des œufs mais pas de sperme peut révéler une contamination accidentelle des œufs par le sperme (Chapman, 1991).

4.2 Mise en route et réalisation de l'essai

On doit provoquer le frai de plusieurs échinides afin de recueillir le sperme. On peut combiner le sperme de tous les organismes avant de commencer l'essai. On procède de la même façon pour les œufs. Le sperme est exposé pendant 10, 20 ou 60 min à la substance ou à la matière d'essai placée dans chaque récipient. On ajoute ensuite un nombre approprié d'œufs dans chaque récipient et on poursuit l'exposition pendant 10 ou 20 min pour permettre la fécondation. Finalement, on ajoute un agent de conservation dans tous les récipients pour mettre fin à l'exposition.

4.2.1 Collecte des gamètes en vue de l'essai

Idéalement, le sperme devrait provenir de ≥ 3 échinides mâles adultes de l'espèce choisie et les œufs, de ≥ 3 femelles. Étant donné que le sperme ou les œufs d'un organisme donné peuvent être particulièrement sensibles ou, à l'inverse, tolérants, on devrait chercher à obtenir des unités expérimentales homogènes (c.-à-d. éviter des variations en lien avec les parents). La seule façon pratique de procéder consiste à combiner les gamètes mâles ou femelles provenant de parents différents avant de les transférer dans les récipients d'essai; toutefois, la combinaison de gamètes de bonne qualité et de qualité médiocre peut nuire au succès de la fécondation. En conséquence, il faut vérifier les gamètes (v. paragraphe suivant) de chaque mâle et de chaque femelle afin de s'assurer que seuls les gamètes de bonne qualité serviront à l'essai. Si on ne peut obtenir des gamètes de bonne

qualité de 3 adultes de chaque sexe (v. paragraphe suivant) et/ou si, en plus de la vérification des gamètes, on procède à un prétest avec une combinaison de gamètes de ≥ 2 mâles et ≥ 2 femelles (v. description en 4.2.3), il est possible d'utiliser les gamètes d'un seul adulte de chaque sexe (c.-à-d. le mâle et la femelle dont les gamètes ont donné de bons résultats sur le plan de la fécondation une fois combinés aux fins de la vérification des gamètes et du prétest).

Il faut vérifier les gamètes pour s'assurer que le sous-échantillon de gamètes des mâles et des femelles adultes choisis comme sources probables de sperme et d'œufs pour l'essai présente un taux de viabilité élevé. Pour ce faire, on choisit 3-5 femelles et ≥ 3 mâles dont on examinera les gamètes respectifs au microscope. On provoque le frai de chaque organisme et on dépose les gamètes dans des récipients distincts. On conserve séparément le sperme de chaque mâle sur de la glace. On en dilue une petite quantité avec de l'eau témoin/de dilution sur une lame pour évaluer au microscope la motilité des spermatozoïdes. On examine également au microscope les œufs de chaque femelle. Les œufs de qualité médiocre sont petits, vacuolisés et de forme irrégulière. On transfère ensuite dans plusieurs flacons à scintillation de petites aliquotes d'œufs de chaque femelle dont les œufs sont de « bonne qualité ». On féconde des groupes distincts d'œufs provenant de chaque lot de « bonne qualité » avec quelques gouttes de sperme dilué provenant lui aussi de lots de « bonne qualité ». Par exemple, si l'examen porte sur les gamètes de 4 femelles et de 3 mâles, on prépare 3 flacons d'œufs par femelle (c.-à-d. un flacon d'œufs pour chaque mâle dont on a provoqué le frai). On verse dans chaque flacon 5-7 gouttes de sperme légèrement dilué (soit 20-50 μL de sperme concentré ou « sec » dans 10 mL d'eau de mer filtrée) de l'un des 3 mâles (les œufs de chaque flacon sont fécondés avec le sperme d'un mâle différent). Après 10 min, on observe au microscope chaque mélange de sperme et d'œufs. On évalue la qualité du sperme d'après la motilité, l'activité et l'agglutination des

spermatozoïdes et d'après le succès de la fécondation. On évalue la qualité des œufs d'après leur forme, leur couleur et leur taille et d'après le succès de la fécondation.

Le nombre d'œufs fécondés dans chaque flacon devrait également être examiné. Si ce nombre est élevé (95-100 %) dans un flacon en particulier et qu'un prétest (v. 4.2.3) est réalisé avec des gamètes du même lot (c.-à-d. les gamètes de chaque mâle et de chaque femelle, déposés sur de la glace) afin de déterminer le rapport spermatozoïdes:œufs optimal, on peut alors utiliser pour l'essai définitif les lots originels de sperme du mâle et d'œufs de la femelle pour lesquels les aliquotes combinées (sous-échantillons) affichaient un taux de fécondation élevé. Si un laboratoire choisit de ne pas effectuer de prétest pour déterminer le rapport spermatozoïdes:œufs « optimal », il doit utiliser les gamètes combinés de ≥ 3 mâles et de ≥ 3 femelles, gamètes dont la bonne qualité a été établie au cours de la vérification. Seuls des gamètes de bonne qualité sont combinés et utilisés dans l'essai²¹. S'il est impossible d'obtenir des gamètes de qualité de 3 mâles et de 3 femelles, on peut réduire le nombre d'adultes, mais il faudra effectuer, avant l'essai définitif, un prétest qui permettra d'établir le rapport spermatozoïdes:œufs optimal pour un lot donné de gamètes, ce qui accroîtra la probabilité du succès de la fécondation chez les témoins. Selon Chapman (1992a), la haute qualité des gamètes est plus importante que leur combinaison.

On provoque le frai en injectant aux adultes du chlorure de potassium (KCl)²². On injecte aux oursins globuleux 0,5-1,0 mL de KCl 0,5 M à travers la membrane du péristome (c.-à-d. entre la lanterne d'Aristote et le test) selon un angle allant vers l'extérieur du test, dans le cœlome

²¹ Critères de qualité : des œufs gros et ronds, des spermatozoïdes actifs et un taux de fécondation élevé (soit 90-100 %).

²² Pour préparer une solution de KCl 0,5 M, il faut ajouter 3,75 g de KCl à 100 mL d'eau distillée ou d'eau désionisée.

(v. figure 2)²³. La dose de KCl peut être divisée et injectée dans plusieurs endroits autour de la lanterne d'Aristote; on peut aussi secouer doucement l'oursin afin de répartir la dose dans son organisme. Dans le cas des oursins plats, on injecte, à un angle, 0,5 mL de la même solution dans la bouche. Une seringue à tuberculine munie d'une aiguille de calibre 25 convient parfaitement. On peut aussi stimuler le test pendant 30 s au moyen d'électrodes dans lesquelles passe un courant continu de 12 V²⁴, mais cette méthode semble fonctionner pour l'oursin violet de l'Atlantique seulement.

La technique privilégiée et recommandée pour recueillir le sperme des oursins globuleux est la « collecte à sec ». Une fois le sperme mouillé, sa viabilité diminue grandement (v. note 25). Le sperme devrait donc être recueilli à sec pour qu'il reste viable aux fins de la vérification des gamètes et du prétest (v. 4.2.3), puis de l'essai définitif. Il faut prendre bien soin d'éviter que le sperme « sec » soit contaminé par l'eau ou par la solution de KCl injectée aux organismes pour provoquer le frai. Une des techniques de collecte à sec consiste à placer un mâle adulte, face aborale vers le bas, dans un bécher sec ou une boîte de Petri sèche. On recueille ensuite le sperme au fond du contenant (plutôt qu'à la surface de l'animal). Une autre technique consiste à déposer les mâles sur leur face orale dans un bécher, puis à ajouter de l'eau

²³ Le site Web suivant fournit une bonne description et un diagramme animé de l'injection de la solution provoquant le frai chez les oursins globuleux : <http://www.stanford.edu/group/Urchin/ani-plus.htm>.

²⁴ On peut construire un électro-stimulateur à partir d'une boîte en aluminium contenant un mini-transformateur qui convertit un courant de 115 V en un courant de 12/24 V à 2,4 A. Le courant sortant est dirigé vers deux ports auxquels sont branchées des sondes électriques (comme celles utilisées dans les testeurs de courant électrique). Une fois branchées, les deux sondes sont mises en contact avec la partie aborale de l'oursin, près des gonopores, pendant de brèves périodes (10-30 s), ce qui provoque le frai. Généralement, l'oursin fraie pendant un bref laps de temps seulement au cours de la stimulation électrique. Par contre, si les gonades des oursins sont très mûres, le frai se poursuivra même si la stimulation est arrêtée (Carr, Nipper et Biedenbach, comm. pers., 2008).

témoin/de dilution jusqu'à mi-hauteur du test. Le sperme, qui est exsudé par les pores et qui s'accumule sur la surface de l'organisme, est recueilli à l'aide d'une micropipette, transféré dans une petite éprouvette munie d'un bouchon ou d'un couvercle, puis conservé sur de la glace. Ici encore, il faut s'assurer que la surface sur laquelle le sperme sera libéré (c.-à-d. le fond d'une boîte de Petri ou la surface de l'oursin) est sèche pour éviter de mouiller le sperme et, ainsi, de l'activer. On peut procéder de la même façon pour recueillir les œufs, mais ceux-ci devraient être rincés avant d'être entreposés conformément aux indications ci-dessous.

Les clypéastres excentriques pourraient ne pas produire une quantité suffisante de sperme lorsqu'on utilise la technique de collecte à sec. On peut provoquer le frai de ces clypéastres dans un volume minimal d'eau de mer (5 mL)²⁵, mais il serait préférable de les suspendre au-dessus de la colonne d'eau. (Il a été constaté que les oursins plats ne fraient pas si leur face aborale est en contact direct avec le fond d'une boîte de Petri rincée à l'eau de mer.)

Si on provoque le frai dans de l'eau, on place l'organisme sur sa face aborale dans un petit bécher d'une capacité de 50-250 mL ou d'une taille appropriée, entièrement rempli d'eau témoin/de dilution à la température d'essai. Une fois le sperme ou les œufs libérés, on extrait le plus d'eau possible. On peut aussi placer les femelles sur leur face orale dans un récipient contenant juste assez d'eau témoin/de dilution pour couvrir le test à hauteur de ~1 cm. Les œufs sont ensuite recueillis sur la surface du test, puis transférés dans un petit bécher ou un autre récipient approprié.

Si le frai ne se produit pas dans les 5-10 min suivant l'injection, on peut faire une deuxième injection, mais cela peut amener les organismes à libérer des gamètes immatures ou de qualité

²⁵ On accroît grandement la viabilité des gamètes des oursins plats lorsqu'on provoque le frai dans de l'eau de mer dont la salinité est de >30 g/kg (Pickard, comm. pers., 2008).

médiocre. L'adulte devrait libérer le sperme ou les œufs sous la forme d'un filet continu, moins de 30 min après la dernière injection. Le sperme libéré dans l'eau prend l'aspect d'un filet dense et blanc, alors que les œufs ont un aspect granulaire et sont généralement de couleur pastel (rosâtre chez les oursins plats). Il arrive parfois que des produits colorés soient exsudés avant ou pendant le frai, mais il ne faudrait pas les confondre avec les gamètes.

La collecte des gamètes devrait prendre fin 15 min après le début de leur libération. Il faudrait recueillir suffisamment de gamètes des mêmes organismes pour la vérification des gamètes, le prétest et l'essai définitif. Les différents prélèvements de gamètes provenant du même organisme sont normalement combinés à l'aide d'une pipette. Pour la manipulation des œufs, beaucoup de responsables d'essai se servent de micropipettes en plastique, d'une capacité de 1 mL, qu'ils amputent de 2-3 mm à l'aide d'un scalpel afin d'obtenir un diamètre de 1 mm et de réduire ainsi les risques de dommage aux œufs.

Le sperme recueilli à sec peut être conservé sur de la glace²⁶ pendant 4 h avant d'être « activé » dans de l'eau de mer; il peut ensuite être utilisé dans un délai de 30-120 min²⁷. Si on recueille le

²⁶ Les flacons de sperme peuvent être enveloppés dans des essuie-tout afin d'éviter que le sperme ne gèle (Carr, Nipper et Biedenbach, comm. pers., 2008).

²⁷ Lorsqu'il entre en contact avec l'eau de mer, le sperme subit une série de changements métaboliques qui permettent aux spermatozoïdes de féconder des œufs. Une période d'activité intense de ≤1 h suit l'activation, puis il y a perte graduelle de vitalité au cours des 6-9 h qui suivent, cette détérioration étant plus rapide à des températures plus élevées (Dinnel et coll., 1987). D'après une étude, la variabilité des résultats s'accroît grandement si le sperme est conservé dans de l'eau de mer avant l'essai. Un essai comparatif de la toxicité d'un effluent de fabrication de pâte de papier kraft blanchie sur la fécondation chez les clypéastres excentriques a montré qu'une « préactivation » du sperme dans de l'eau de mer pendant 60 min aux fins d'un essai de 80 min produisait un CV de 91 %, contre 38 % dans les cas d'un essai sans préactivation. De plus, la préactivation augmentait la sensibilité de l'essai par un facteur de 1,6, ce qui

sperme dans des béciers remplis d'eau de mer, on devrait commencer l'essai dans les 30-120 min après la fin de la collecte. Dans l'intervalle, il faut le conserver dans une quantité minimale d'eau, sur de la glace.

On rince les œufs à 3 reprises. On ajoute d'abord 100 mL d'eau témoin/de dilution, on mélange, on laisse reposer 10 min, puis on décante. Si on recueille une substance pigmentée en même temps que les œufs, il serait indiqué de rincer ces derniers aussitôt que possible après la collecte, car cette substance peut être toxique pour l'oursin violet du Pacifique et, dans certains cas, pour d'autres espèces²⁸. Les œufs peuvent être conservés dans la dernière eau témoin/de dilution, à la température d'essai, pendant au plus 4 h avant leur utilisation. On recommande d'aérer légèrement les œufs pendant ce temps.

4.2.2 Préparation de suspensions types de gamètes

On combine le sperme des oursins globuleux ou des oursins plats choisis après vérification des gamètes (v. 4.2.1) afin d'obtenir une suspension concentrée de sperme de qualité. Si le sperme a été recueilli dans des béciers remplis d'eau, on

représente un faible changement par rapport à l'augmentation du CV (NCASI, 1992).

On peut retarder l'activation du sperme et la mise en route de l'essai en gardant le sperme au froid (sur de la glace), dans les mêmes conditions que lors de la collecte à sec. À des fins de normalisation, on conseille fortement de respecter les recommandations présentées en 4.2.1 concernant la période de conservation des gamètes. On peut toutefois utiliser d'autres périodes et d'autres techniques s'il est démontré qu'elles donnent généralement lieu à des taux de fécondation de ~90 % chez les témoins. Selon certains responsables d'essai, le sperme « sec » peut être conservé sur de la glace pendant de plus longues périodes, par exemple 8 h dans le cas de l'oursin violet de l'Atlantique (Carr et Chapman, 1992), bien qu'on ne les conserve généralement pas plus de 4 h (Chapman, 1992a).

²⁸ Du fait qu'une trop grande manipulation risque de réduire le succès de la fécondation, il n'est peut-être pas nécessaire de rincer les œufs pour les débarrasser de cette substance pigmentée (Buday, comm. pers., 2008).

doit le prélever sur le fond des béciers à l'aide d'une pipette. Le sperme devrait être transféré lentement (pour ne pas provoquer de cavitation) à l'aide d'une micropipette (diamètre de ≥ 1 mm) et déposé dans l'eau en vidant la pipette et en la rinçant à plusieurs reprises avec l'eau dans laquelle on dépose le sperme.

La densité spermatique de la suspension initiale est évaluée à l'aide d'un hémocytomètre ou d'un autre appareil de numération cellulaire d'une capacité de grossissement de 400 fois²⁹. Pour ce faire, on dilue 100-10 000 fois (selon la concentration du sperme) une petite quantité (0,1-1 mL) de la suspension avec de l'acide acétique cristallisable à 10 %, préparé avec de l'eau témoin/de dilution. Il faut ensuite mélanger en retournant 10 fois le récipient, puis attendre que les bulles disparaissent, ce qui prend 1-2 min. On place une goutte du mélange dans la chambre de numération de l'hémocytomètre et on attend 15 min afin que les spermatozoïdes se déposent. Il faut compter les spermatozoïdes qui se trouvent dans les 400 petits carrés du milieu. On calcule le nombre de spermatozoïdes présents dans 1 mL de suspension initiale à l'aide de l'équation suivante : (facteur de dilution) \times (nombre de spermatozoïdes) \times (facteur de conversion de l'hémocytomètre) \times (facteur de conversion des millimètres cubes en millilitres) \div (nombre de carrés comptés). Si on utilise un hémocytomètre type (Neubauer), l'équation est la suivante :

$$\text{nombre de spermatozoïdes/mL} = 100 \times (\text{spermatozoïdes dénombrés}) \times 4\,000 \times 1\,000 \div 400$$

Il faut amener la concentration de la suspension initiale de sperme à la concentration désirée pour une suspension type, en utilisant de l'eau

²⁹ Chapman (1992a) fournit des explications très détaillées concernant l'hémocytomètre et son utilisation pour la numération spermatique.

témoin/de dilution³⁰. La concentration de cette suspension type est déterminée par le rapport spermatozoïdes:œufs choisi (v. 4.2.3).

Pour la numération spermatique, on peut aussi avoir recours à la turbidité ou à la densité optique comme indicateur du nombre de spermatozoïdes/mL, sans utiliser l'hémocytomètre. Cette technique présente l'avantage d'accélérer le processus, car cette mesure ne demande que quelques minutes, alors que la numération à l'aide d'un hémocytomètre demande 20-30 min (NCASI, 1992). Elle permet donc de commencer l'essai plus rapidement après la collecte des gamètes. Dans un tube de spectrophotométrie de 1 cm, on mélange la solution concentrée de sperme à de l'eau témoin/de dilution juste avant de commencer l'essai. On peut utiliser des turbidimètres types conçus pour l'analyse d'échantillons d'eau. Selon le NCASI (1992), une plage de 2,0-4,0 unités de turbidité néphélométrique (uTN) correspond à la concentration spermatique souhaitée. Une teneur de 2,5 millions de spermatozoïdes/mL serait associée à ~3,0 uTN chez le clypéastre excentrique et à ~2,7 uTN chez l'oursin violet du Pacifique. Les mesures de la turbidité offrent une précision presque aussi élevée que la numération. Le NCASI (1992) a établi que le CV moyen des résultats de numérations répétées à l'aide d'un hémocytomètre était de ~9 % lorsque les dilutions de sperme provenaient d'un seul organisme et de 12 % lorsqu'elles provenaient de 3 mâles (5 uTN dans les 2 cas). Au moment de la préparation du présent document, aucun autre laboratoire n'était en mesure de fournir une évaluation de l'analyse turbidimétrique. Le dernier critère permettant de

déterminer si l'évaluation turbidimétrique de la densité spermatique a donné des résultats satisfaisants serait le taux de fécondation chez le témoin pendant l'essai par rapport au critère de validité de ≥ 60 % et de < 98 % de fécondation (v. 4.5.1).

On peut choisir le volume type initial de 10 mL, ou encore un volume de 5 mL ou de 2 mL pour l'essai. La concentration de gamètes étant la même dans tous les cas, on ajoute donc au volume choisi une quantité proportionnelle de la suspension de gamètes. Ainsi, dans le volume le plus élevé (10 mL), on ajoute 0,1 mL de la suspension spermatique et 1,0 mL de la suspension d'œufs. (Le tableau 4 indique le nombre de gamètes et le volume de la suspension à ajouter aux 3 volumes d'essai.)

Les présentes recommandations quant au nombre de gamètes à ajouter aux solutions et quant aux méthodes à employer s'appliquent à un essai où on utilise un volume initial de 10 mL. On doit d'abord calculer la concentration souhaitée pour la suspension de sperme. Avec un volume de 10 mL, on utilise ~2 000 œufs et le rapport spermatozoïdes:œufs se situe le plus souvent entre 50:1 et 2 500:1 (v. 4.2.3), bien qu'il puisse parfois atteindre $\geq 20\,000:1$. S'il se situe entre 50:1 et 2 500:1, le nombre de spermatozoïdes nécessaire variera de 100 000 à 5 millions. Puisqu'on ajoute 0,1 mL de la suspension spermatique, la concentration de spermatozoïdes de la suspension type devra normalement se situer entre 1 million et 50 millions/mL³¹.

³⁰ Il n'existe pas de directives précises quant à la quantité d'eau à utiliser dans la suspension initiale. C'est la technique de collecte du sperme qui permet de déterminer la concentration de la suspension spermatique initiale ainsi que la dilution nécessaire pour obtenir une suspension type. Normalement, chaque laboratoire et chaque responsable d'essai met au point des méthodes normalisées de collecte et de dilution qui permettent d'obtenir des concentrations et des dilutions relativement prévisibles et satisfaisantes aux fins de la numération.

³¹ On peut utiliser d'autres volumes de la solution spermatique en modifiant de façon appropriée la concentration de spermatozoïdes de la suspension, mais il est déconseillé d'utiliser des volumes supérieurs à celui recommandé ici. Certaines méthodes, par exemple, préconisent l'emploi de 0,5 mL de la solution spermatique, ce qui entraînerait une diminution de la concentration de la substance ou matière d'essai de l'ordre de 5 %; ce changement assez considérable devrait alors être pris en compte dans les calculs visant à évaluer l'effet. L'ajout du volume recommandé de 0,1 mL de la suspension spermatique entraîne une variation si faible de la concentration qu'elle est, à toutes fins utiles, négligeable.

On peut facilement déterminer les dilutions à utiliser grâce à l'équation type suivante :

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

« concentration 1 × volume 1 = concentration 2 × volume 2 ».

Par exemple, si la numération révèle que la concentration de la suspension initiale est de 125 millions de spermatozoïdes/mL et qu'on désire utiliser 5 mL d'une suspension type dont la concentration est de 40 millions/mL, on pourrait calculer comme suit le volume nécessaire (V1) de la suspension initiale qui devra être porté à 5 mL :

$$125 \times V1 = 40 \times 5, \text{ donc } V1 = 1,6 \text{ mL.}$$

On détermine la densité de la suspension d'œufs en procédant à une numération, puis on prépare une solution dont la concentration est de 2 000 œufs/mL.

Pour la numération, on ajoute 1 mL ou moins de la suspension à une cellule de Sedgwick-Rafter et on l'observe sous un grossissement de 20-100 fois. Il peut être utile de diluer 10 fois, 100 fois ou même 1 000 fois une aliquote pour la numération. À mesure qu'on gagne de l'expérience, on peut diluer la suspension initiale en se fondant simplement sur son aspect, jusqu'à l'obtention d'une concentration de quelques centaines d'œufs/mL pour ensuite compter le nombre d'œufs présents dans 0,5 mL. Toute autre technique de numération jugée efficace peut être utilisée. Il est possible d'ajuster la densité de la suspension de façon à atteindre une concentration de 2 000 œufs/mL en y ajoutant de l'eau témoin/de dilution ou, s'il faut augmenter sa densité, en laissant les œufs sédimenter avant d'extraire l'eau de la suspension.

Pour un volume d'essai de 5 mL, on procède exactement de la même façon, mais on ajoute de plus petits volumes de la suspension de gamètes aux récipients d'essai (tableau 4), soit 0,05 mL

de la suspension spermatique (contenant généralement 2-25 millions de spermatozoïdes, selon le rapport spermatozoïdes:œufs souhaité) et 0,5 mL de la suspension d'œufs (contenant 1 000 œufs).

Pour un volume initial de 2 mL, on réduit proportionnellement le volume des suspensions de gamètes : 0,02 mL de la suspension spermatique (contenant généralement 0,8-10 millions de spermatozoïdes) et 0,2 mL de la suspension d'œufs (contenant ~400 œufs).

4.2.3 Rapport spermatozoïdes:œufs

Chaque laboratoire devrait procéder à un prétest afin de déterminer le rapport optimal spermatozoïdes:œufs, soit celui qui produit un taux de fécondation de 80 % dans des conditions contrôlées³². Si les taux de fécondation étaient très faibles chez les témoins, il pourrait être difficile de faire la distinction entre les effets d'un toxique sur la fécondation et une performance généralement médiocre et variable en l'absence du toxique de référence. Toutefois, des taux de fécondation élevés peuvent indiquer une surconcentration de spermatozoïdes susceptible de masquer, en le compensant partiellement, l'effet du toxique, ce qui réduit la sensibilité de l'essai et augmente la

³² Un taux cible de fécondation de 90 % a été établi au départ du fait qu'il contribue à éliminer les risques de sous-concentration ou de surconcentration de spermatozoïdes. Pour la présente édition de la méthode, ce taux a été abaissé à 80 % à cause des préoccupations que soulevait la perte de sensibilité de l'essai à des taux plus élevés de fécondation chez les témoins (v. note de bas de page suivante). De plus, la plupart des laboratoires du Canada et des États-Unis ayant participé à une enquête récente (v. 1.1) ont indiqué qu'ils visaient un taux de fécondation de 80 % chez les témoins puisqu'ils obtenaient ainsi de meilleurs résultats (c.-à-d. des résultats plus précis). Il est possible que d'autres organismes décident d'adopter des essais normalisés préconisant des taux de fécondation plus élevés dans des conditions contrôlées, peut-être de ≥95 %. Un tel objectif viserait à réduire les variations interlaboratoire au détriment de la sensibilité. Pour obtenir un taux de fécondation de 80 %, il faut souvent atteindre un équilibre assez fragile entre le rapport spermatozoïdes:œufs et d'autres facteurs, et chaque laboratoire doit mettre au point des méthodes appropriées.

Tableau 4. Tableau récapitulatif des quantités de spermatozoïdes et d'œufs à ajouter à chaque récipient d'essai pour les trois volumes d'essai

Le nombre de spermatozoïdes apparaissant dans les colonnes 4/5 et 7 est déterminé par des rapports spermatozoïdes:œufs de 200:1 et de 2 500:1 choisis à titre d'exemples.

Volume d'essai initial (mL)	N ^{bre} d'œufs	Volume de la suspension d'œufs (mL)	N ^{bre} de spermatozoïdes (millions)		Volume de la suspension spermatique ajouté (mL)	Plage courante de concentration de la suspension spermatique (millions/mL)
			pour les rapports spermatozoïdes:œufs courants			
			200:1	2 500 :1		
10	2 000	1,0	0,4	5	0,1	4-50
5	1 000	0,5	0,2	2,5	0,05	4-50
2	400	0,2	0,08	1	0,02	4-50

CI₂₅³³. On dispose de plusieurs méthodes pour établir le rapport spermatozoïdes:œufs qui convient puisque le critère de conformité d'un essai est le taux de fécondation réel chez le témoin, qui doit se situer entre $\geq 60\%$ et $< 98\%$ (limites de contrôle) pour que l'essai soit valide (v. 4.5.1).

³³ La documentation fait état de certains essais où des taux plus élevés de fécondation chez les témoins, attribuables à un rapport spermatozoïdes:œufs élevé, entraînaient une perte appréciable de sensibilité de l'essai. Le NCASI (1992) a constaté que, dans 7 essais jumelés sur un effluent d'une fabrique de pâte, les moins sensibles étaient ceux pour lesquels le taux de fécondation chez les témoins était le plus élevé (d'après les CI₅₀ obtenues pour les gamètes de clypéastes excentriques). Les 7 essais pour lesquels le taux de fécondation chez les témoins se situait à 94 % en moyenne étaient 2,2 fois moins sensibles, en moyenne, que les 7 essais comparatifs pour lesquels ces taux n'atteignaient que 84 % en moyenne. Dans une autre série de 11 essais réalisés par le NCASI (1992) sur un échantillon d'effluent d'une fabrique de pâte kraft, la moyenne géométrique des CI₂₅ de l'effluent se situait à 2,9 % si on utilisait un faible rapport spermatozoïdes:œufs et passait à 6,7 % pour un rapport spermatozoïdes:œufs élevé; l'essai utilisant un rapport spermatozoïdes:œufs élevé était donc 2,3 fois moins sensible. De la même façon, Dinnel et coll. (1987) ont montré que la CI₅₀ de l'argent chez le clypéastre excentrique était de 23 µg/L lorsqu'on utilisait un faible rapport spermatozoïdes:œufs, mais de 37 µg/L avec un rapport spermatozoïdes:œufs élevé, ce qui indique une diminution de la sensibilité par un facteur de 1,6.

D'après la documentation, les rapports spermatozoïdes:œufs se situant entre 50:1 et 2 500:1 donnent des taux de fécondation satisfaisants pour les espèces d'essai (v. annexe D). Les rapports qui suivent, signalés par les laboratoires du Canada et des États-Unis ayant participé à une enquête récente (v. 1.1), ont permis d'obtenir un taux de fécondation de 70-90 % : oursin vert, 2 000:1 et jusqu'à 5 000:1³⁴; oursin violet du Pacifique, généralement entre 100:1 et 500:1, mais aussi peu que 2:1 et jusqu'à 2 000:1; clypéastre excentrique, souvent autour de 200:1 et jusqu'à 400:1, mais aussi entre 50:1 et 6 000:1 selon des sources fiables; oursin blanc, généralement 20 000:1; oursin violet de l'Atlantique, 2 500:1. Des lignes directrices aussi sommaires ne peuvent toutefois pas garantir l'obtention de résultats satisfaisants par tous les laboratoires et pour toutes les périodes du frai. Des essais interlaboratoire canadiens, par exemple, ont montré que le rapport spermatozoïdes:œufs devait parfois être 10 fois supérieur aux valeurs mentionnées ci-dessus (Miller et coll., 1992).

³⁴ Des essais menés en mai 2008 ont confirmé que, pour l'oursin vert, un rapport spermatozoïdes:œufs de 5 000:1 a donné un taux de fécondation de ~90 % à 10 °C ou 15 °C pour une durée d'exposition de 10 + 10 min (Jackman, comm. pers., 2008).

Idéalement, on devrait établir le rapport spermatozoïdes:œufs approprié immédiatement avant chaque essai, en se servant des gamètes qui seront utilisés dans l'essai. On peut écourter et simplifier le prétest en adoptant 1-2 rapports jugés relativement bas. En se fondant sur les résultats obtenus, on pourrait porter le nombre de gamètes qu'on désire utiliser sur une « courbe du succès de la fécondation » construite à partir des expériences antérieures du laboratoire, ce qui permettrait de choisir un rapport approprié au moment de procéder à l'essai proprement dit.

Un autre prétest peut être effectué pour déterminer le rapport spermatozoïdes:œufs à utiliser pour obtenir un taux de fécondation de 80 % chez les témoins (Carr et Chapman, 1995)³⁵. Ainsi, on fait appel à deux répétitions de l'eau témoin/de dilution et à une répétition de chacune des 3 concentrations d'un toxique de référence en regard desquelles chaque rapport spermatozoïdes:œufs (c.-à-d. 5) sera mesuré afin de déterminer celui qui sera « optimal » pour l'essai. Les rapports spermatozoïdes:œufs employés dans le prétest devraient couvrir une plage étendue de concentrations spermatiques (p. ex., écart d'un ordre de grandeur entre chacune). On exécute le prétest de la même façon que l'essai habituel, avec ajout d'une aliquote adéquate de sperme dans chaque flacon, puis ajout des œufs après le temps d'exposition qui convient. Une fois le pourcentage de fécondation établi pour tous les rapports spermatozoïdes:œufs de chaque traitement, on se base sur le taux de fécondation obtenu dans l'eau témoin/de dilution (taux ciblé : 80 %) pour choisir le rapport spermatozoïdes:œufs qui maximisera la possibilité d'obtenir, avec le toxique de référence, des résultats qui se situeront à

³⁵ Carr et Chapman (1995) utilisent des dilutions de sperme (exprimées sous forme de rapport volume de sperme « sec »:volume d'eau de mer) plutôt que des rapports spermatozoïdes:œufs pour obtenir (et exprimer) diverses concentrations de sperme. Toutefois, dans la présente (deuxième) édition de la méthode d'essai, c'est le rapport spermatozoïdes:œufs qui est utilisé à cette fin, tout comme dans la première édition du rapport SPE 1/RM/27.

l'intérieur des limites de la zone de confiance de la carte de contrôle. Cette façon de procéder permet de choisir le rapport spermatozoïdes:œufs affichant la sensibilité qui convient quant au taux de fécondation optimal ciblé chez les témoins.

Il est recommandé de procéder à ce prétest pour les essais sur l'eau de porosité. Il faudrait prévoir 2 répétitions de l'eau de porosité témoin (v. 8.1.4) en plus des 2 répétitions de l'eau témoin/de dilution et de 1 répétition de chacune des 3 concentrations du toxique de référence (v. plus haut)³⁶. On peut combiner le prétest à une vérification étendue des gamètes en ayant recours à des combinaisons données de gamètes de mâles et de femelles individuels (p. ex., le sperme de chacun des mâles est mis à l'essai avec les œufs de chacune des femelles pour déterminer quelle combinaison de gamètes affiche la meilleure qualité; v. 4.2.1). Ainsi, une fois les gamètes de chaque mâle et de chaque femelle combinés selon le bon rapport spermatozoïdes:œufs, on obtient le taux idéal de fécondation chez les témoins, de même que la sensibilité adéquate en regard du toxique de référence (en d'autres termes, les résultats se situeront à l'intérieur des limites de la zone de confiance de la carte de contrôle). On peut ensuite choisir ces gamètes pour l'essai définitif, car on connaît d'avance le rapport spermatozoïdes:œufs qui convient.

Dans la pratique, tout laboratoire peut, à partir de son expérience, établir un rapport « type » qui donne généralement les résultats escomptés pour une espèce donnée. Toutefois, l'utilisation

³⁶ Ce prétest a été mis au point à la Marine Ecotoxicology Research Station, Columbia Environmental Research Centre, pour les essais sur l'eau de porosité (Carr, Nipper et Biedenbach, comm. pers., 2008). Il a été employé au cours d'une recherche interlaboratoire effectuée en 2008 en vue de déterminer de quelle façon améliorer la partie de l'essai portant sur l'eau de porosité décrit dans la présente méthode (Miller, 2008). Les laboratoires participants ont constaté que le prétest convenait puisqu'il permettait de recueillir plus de renseignements sur lesquels on peut fonder le choix du rapport spermatozoïdes:œufs à utiliser dans l'essai définitif.

systematique d'un rapport « type » risque de réduire la qualité de l'essai. Ainsi, lorsqu'un rapport type donne un taux de fécondation de <60 % ou de ≥ 98 % chez les témoins (v. 4.5.1), l'essai ne serait pas valide et devrait être repris à l'aide d'un autre rapport. D'autres essais peuvent perdre de leur sensibilité s'il y a « surconcentration » spermatique. Le rapport spermatozoïdes:œufs doit parfois être ajusté en fonction de la période du frai – on a signalé des cas où le rapport a dû être décuplé (Chapman, comm. pers., 1992b).

Compte tenu de la variation normale du taux de fécondation chez les témoins, on recommande fortement d'effectuer un prétest. Les responsables des essais qui connaissent bien l'essai sur la fécondation chez les échinides considèrent que le prétest effectué pour chaque essai définitif leur a permis, à long terme, d'économiser beaucoup de temps et d'argent ainsi que de sauvegarder des échantillons parfois irremplaçables.

Plutôt que d'effectuer un prétest témoin, on peut préparer 2-3 répétitions des rapports spermatozoïdes:œufs pour chaque concentration d'essai, y compris pour les témoins. On utiliserait alors les résultats obtenus en regard du rapport ayant donné un taux de fécondation de 80 % chez les témoins pour calculer la CI_p (v. 4.5.2). Le NCASI (1992) souligne que cette façon de procéder est plus rapide qu'un prétest suivi d'un essai; elle permet aussi d'éviter que des changements dans l'activité des spermatozoïdes ne surviennent entre le prétest et l'essai proprement dit.

Si le rapport spermatozoïdes:œufs est déterminé par un prétest ou arbitrairement, il faut aussi établir la densité de la suspension spermatique à utiliser (v. 4.2.2). Par exemple, s'il faut ajouter 2 000 œufs pour atteindre un rapport de 2 000:1, le volume de 0,1 mL de suspension spermatique ajouté devra contenir 4 millions de spermatozoïdes, ce qui correspond à 40 millions de spermatozoïdes par mL de suspension.

4.2.4 Exposition des gamètes

Pour l'exposition, on place les récipients dans un support pour tubes à essai ou tout autre type de support, lui-même placé dans un bain-marie ou un autre appareil à température contrôlée. Les récipients doivent être disposés de façon aléatoire dans le support ou à l'intérieur de chaque colonne; dans ce dernier cas, chaque colonne contient une répétition de chaque concentration et du témoin³⁷. Tous les récipients doivent porter une étiquette ou un code correspondant à leur position, ce qui permettra d'identifier les concentrations et les répétitions.

Lors de la préparation d'aliquotes représentatives des solutions d'essai (c.-à-d. les témoins plus au minimum les concentrations élevée, moyenne et faible s'il s'agit d'un essai à concentrations multiples), on doit en mesurer la température, la salinité, la teneur en OD et le pH. Si le protocole d'essai l'exige ou le permet, les valeurs doivent ou devraient être ajustées aux niveaux acceptables (v. 4.3) avant l'ajout des solutions dans les récipients d'essai.

Pour l'essai, on peut choisir entre 3 durées d'exposition qui n'ont par ailleurs aucune incidence sur la méthode d'essai utilisée. Évidemment, on ne peut choisir qu'une seule durée pour un essai donné ou pour des essais comparatifs. L'exposition la plus courte sert normalement aux essais types et à des fins de *surveillance*. On expose le sperme pendant 10 min, on ajoute les œufs et on poursuit l'exposition pendant 10 autres minutes (essai de 20 min). Dans le cas de l'oursin violet de l'Atlantique, la formation de la membrane de fécondation prend plus de temps que chez les

³⁷ On peut déterminer la répartition aléatoire de différentes façons et la plupart des laboratoires utilisent des méthodes qui leur sont propres. Certains laboratoires disposent de programmes informatiques conçus pour répondre aux exigences de l'essai avec des échinides, programmes qui font appel à la génération de chiffres aléatoires. Pour assurer l'objectivité et la validité des tests statistiques, on peut faire un essai à l'aveugle en demandant à une personne autre que celle qui comptera les œufs fécondés d'identifier par codes tous les récipients, y compris ceux des témoins et des toxiques de référence.

4 autres espèces d'essai; il est donc recommandé d'utiliser une durée d'exposition plus longue (20 + 20 min ou 60 + 20 min).

On peut avoir recours à l'une ou l'autre des 2 périodes d'exposition plus longues pour répondre à des exigences particulières, comme une recherche ou une comparaison des résultats avec d'autres données. On peut donc utiliser une exposition du sperme de 20 min, suivie d'une exposition du sperme et des œufs de même durée (essai de 40 min). L'exposition la plus longue comporte une exposition du sperme pendant 60 min, suivie d'une exposition du sperme et des œufs pendant 20 min (essai de 80 min)³⁸.

La durée d'exposition est indépendante des 3 volumes possibles (on a donc 9 options pour l'essai). On utilise généralement un volume d'essai de 10 mL; c'est l'option qui a été

³⁸ On considère généralement que la période d'exposition la plus longue augmente la sensibilité de l'essai toxicologique. Toutefois, l'amélioration de la détection de l'effet toxique s'en trouve réduite, car il se produit généralement une chute du taux de fécondation chez le témoin à cause de la période prolongée de maintien du sperme avant l'ajout des œufs. Le taux de fécondation peut passer de 90 % pour une exposition du sperme de 10 min, à 30 % pour une exposition de 60 min (Pagano et coll., 1983). Il est possible que l'écart apparent entre les résultats obtenus pour le témoin et pour les concentrations d'essai change peu avec une exposition prolongée du sperme (essai sur le cadmium, Pagano et coll., 1986). Lors d'un essai avec le clypéastre excentrique, des responsables d'essai de la Colombie-Britannique ont pu observer cette diminution du taux de fécondation chez le témoin après des périodes d'exposition du sperme de 10 min et de 30 min (van Aggelen, comm. pers., 1992).

Les responsables d'essai canadiens ayant participé à des essais comparatifs interlaboratoire ont privilégié la plus courte période d'exposition (10 + 10 min) (Miller et coll., 1992). La perte de sensibilité de l'essai court est peut-être compensée en partie par une variabilité moins marquée des résultats. Lors de 7 essais parallèles sur la toxicité d'un effluent de fabrique de pâte blanchie pour le clypéastre excentrique, l'essai court (durée totale de 20 min) était 2,4 fois moins sensible que l'essai long (durée totale de 80 min), mais le CV de l'essai de courte durée était 2 fois moins élevé (NCASI, 1992).

retenue dans le présent document³⁹. On procède exactement de la même manière avec des volumes de solution d'essai de 5 mL et de 2 mL, mais on réduit proportionnellement les volumes des suspensions de gamètes (v. tableau 4).

On mélange d'abord la solution de sperme, puis l'essai commence dès l'ajout de 0,1 mL de cette solution à tous les récipients qui contiennent déjà 10 mL de la solution d'essai (v. 4.1.2). À la fin de la période d'exposition du sperme, on agite la préparation d'œufs et on en ajoute 1,0 mL à tous les récipients. Il faut utiliser des micropipettes automatiques afin de respecter les courts délais nécessaires à l'exécution de ces tâches. Il faut faire très attention lorsqu'on ajoute le sperme et les œufs dans les récipients et on doit déverser directement dans la solution d'essai tout le liquide libéré par la pipette en veillant à ce qu'il ne touche pas les parois du récipient; de plus, l'extrémité de la pipette ne doit pas entrer en contact avec la solution d'essai. On devrait agiter les suspensions de gamètes après avoir rempli chaque groupe de 2-3 récipients. Une fois le sperme ajouté, on devrait bien mélanger les solutions en faisant pivoter les récipients, en prélevant et libérant du liquide avec la pipette ou en actionnant brièvement un agitateur-mélangeur vortex; on procède de la même façon après avoir ajouté les œufs.

On devrait établir à quel intervalle le sperme sera ajouté à chaque récipient (p. ex., toutes les 5 s). On devrait ajouter les œufs aux récipients dans le même ordre et suivant le même intervalle que le sperme de façon à uniformiser le temps d'exposition. De la même manière, on devrait mettre fin à l'essai en respectant le même ordre et le même intervalle. On ne devrait pas ajouter les gamètes en fonction des

³⁹ Des responsables d'essai canadiens ayant participé à des essais comparatifs interlaboratoire ont privilégié le volume de 10 mL et l'ont adopté comme norme pour les essais (Miller et coll., 1992). On craignait qu'un plus petit volume réduise la précision des manipulations de liquides et accentue l'« effet de bord » là où l'échantillon est en contact avec l'air et avec les récipients d'essai.

concentrations, mais plutôt par groupe de répétitions, c'est-à-dire en commençant par le premier groupe de répétitions et ainsi de suite (Chapman, 1992a).

Lorsque la période d'exposition du sperme et des œufs est écoulée, on met fin à l'essai en ajoutant à chaque récipient soit ≤ 2 mL de glutaraldéhyde à 1 %, soit ≤ 2 mL de formol tamponné à 10 %⁴⁰. (On divise la quantité d'agent de conservation par 2 ou par 5 si on utilise les petits volumes.) On devrait compter les œufs conservés au plus tard 3 jours après la fin des essais. Lors de l'entreposage, les récipients contenant les œufs devraient toujours être scellés (p. ex., au moyen d'une pellicule de plastique).

4.3 Conditions de l'essai

Il s'agit d'un *essai sans renouvellement* des solutions ni aération. La température d'essai est de 15 °C pour les 4 espèces indigènes et de 20 °C pour les espèces non indigènes. Dans tous les récipients, la salinité est normalement à 1 g/kg près de celle du témoin, la plage étant de 28-32 g/kg. S'il y a lieu, il faut chercher à élever la teneur en OD de toutes les solutions d'essai

⁴⁰ Le formol est une solution de formaldéhyde de 37-40 %. Pour préparer du formol tamponné à 10 %, il faut ajouter 100 mL de formol, 4 g de diphosphate de sodium et 6,5 g d'hydrogénophosphate de disodium anhydre à 900 mL d'eau distillée. L'expérience montre que le volume de substance chimique nécessaire à la conservation des œufs peut être réduit par un facteur atteignant jusqu'à 10. Pour fixer les œufs, on utilise le plus petit volume de substance chimique nécessaire à leur conservation (Buday, comm. pers., 2008). Le formol est une substance dangereuse, à manipuler sous une hotte; la numération des œufs doit également se faire dans un endroit ventilé. On a signalé que le formol peut former un précipitat blanc dans les récipients d'essai contenant de l'eau de porosité, ce qui n'est habituellement pas le cas du glutaraldéhyde (Buday, comm. pers., 2008). La manipulation du glutaraldéhyde devrait aussi se faire sous une hotte ou dans un endroit bien aéré. Les deux substances devraient être gardées à l'écart des zones où les organismes sont maintenus ou soumis aux essais. Certains chercheurs ajoutent une solution d'eau de javel immédiatement avant la numération des œufs afin de neutraliser l'excès de formol.

au-dessus de 40 % de saturation, avant la mise en route de l'essai.

4.3.1 Température

La température d'essai devrait être de 15 °C pour l'oursin vert, l'oursin violet du Pacifique et le clypéastre excentrique. Elle devrait être de 20 °C pour l'oursin violet de l'Atlantique et l'oursin blanc, 2 espèces non indigènes. La température de toutes les solutions d'essai ne devrait pas s'écarter de plus de 1 °C de la valeur visée et déterminée par les mesures des aliquotes ou des récipients sans gamètes (réservés à la surveillance de la température). Avant l'essai, on doit mesurer la température dans les aliquotes ou des témoins, de même que des concentrations d'essai élevée, moyenne et faible.

Les températures d'essai recommandées sont de 3-7 °C plus élevées que les valeurs recommandées pour le maintien des adultes d'une même espèce, mais elles doivent demeurer dans l'échelle biocinétique. Ces températures plus élevées devraient favoriser la détection de certains toxiques⁴¹. Certaines des températures recommandées sont conformes à celles antérieurement utilisées dans les méthodes au Canada ou dans les méthodes normalisées aux États-Unis. Cependant, elles sont inévitablement différentes des températures utilisées ailleurs, étant donné la profusion des méthodes (v. annexe D).

4.3.2 Salinité

La salinité devrait être de 30 g/kg dans un essai classique. Elle devrait être dans la plage de 28-32 g/kg dans toutes les solutions d'essai et

⁴¹ Dans les analyses de fécondation à salinité favorable de 28 g/kg, les CI₅₀ de l'argent diminuaient fortement lorsque les températures passaient de 7 à 12 et à 17 °C. Dans le cas de l'oursin vert, les CI₅₀ étaient respectivement de 215, 110 et 38 µg/L, tandis qu'elles étaient respectivement de 120, 88 et 66 µg/L pour le clypéastre excentrique (Dinnel et coll., 1982). La température d'essai ne semble pas avoir influé de la manière prévue sur les CI₅₀ de l'insecticide endosulfan.

ne pas s'écarter de plus de 1 g/kg par rapport à la salinité du témoin⁴².

Lorsque l'essai a trait à une substance chimique, on devrait porter cette substance à la ou aux concentrations d'essai avec de l'eau témoin/de dilution dont la salinité est dans la plage requise (v. 4.1.1, 5.2 et 5.3). La salinité des échantillons aqueux (p. ex., substances chimiques ou formulations préparées dans de l'eau; effluents, lixiviat) ou des solutions d'essai devrait être mesurée avant l'essai. Si elle est à l'extérieur de la plage de 28-32 g/kg, elle devrait être ajustée

⁴² On considère que la plage de tolérance des gamètes et des larves d'échinide à la salinité est relativement étroite et qu'une faible salinité peut influencer fortement sur l'estimation de la toxicité dans un essai sur la fécondation. Dans le cas de l'oursin violet du Pacifique, par exemple, le taux de fécondation diminuait lorsque la salinité était de 28 g/kg plutôt que de 30 g/kg, et ce, en l'absence de toxique (Oshida et coll., 1981). Par contre, d'autres travaux ont montré que, pour cette même espèce, le taux de fécondation ne commençait à diminuer que lorsque la salinité était de <20 g/kg (Dinnel et coll., 1987). Toutefois, ce dernier résultat peut s'expliquer en partie par un rapport spermatozoïdes:œufs élevé, susceptible de compenser jusqu'à un certain point l'effet d'une faible salinité. Pour ce qui est de l'oursin vert, le taux de fécondation baissait lorsque la salinité était de ≤ 24 g/kg (Dinnel et coll., 1987). On a signalé que des œufs de clypéastre excentrique dont le frai avait été provoqué à des salinités inférieures étaient déformés et qu'ils n'étaient pas fécondés ou qu'ils restaient déformés après avoir été fécondés (Pickard, comm. pers., 2008). Une faible salinité peut s'accompagner d'une augmentation de la sensibilité aux toxiques (ASTM, 1990). Par exemple, pour des oursins verts soumis à des essais à une température de 10 °C, on a observé des CI_{50} de l'argent de 94, 45 et 34 µg/L à des salinités de 30, 28 et 26 g/kg, respectivement, mais peu ou pas de changement des CI_{50} de l'insecticide endosulfan (Dinnel et coll., 1987). La faible salinité a influé tout particulièrement sur l'augmentation de la toxicité de l'argent dans un essai sur la fécondation chez l'oursin vert réalisé à température élevée (17 °C) ou à basse température (7 °C), tandis que la salinité avait peu d'effet lorsque la température était quasi-optimale, soit 12 °C (Dinnel et coll., 1982). Dans un autre essai portant sur l'oursin d'Afrique du Sud (genre *Parechinus*), on a constaté que le succès de la fécondation chutait parallèlement à la diminution de la salinité par rapport à l'eau de mer normale. Pour cette espèce, la salinité optimale se situait entre 28 et 37 g/kg, et les œufs étaient plus sensibles que les spermatozoïdes (Greenwood et Bennett, 1981).

selon l'une ou l'autre des méthodes suivantes :
 1) ajout direct de sels secs à l'effluent ou à une autre matière (p. ex., lixiviat ou élutriat);
 2) ajout de SHS (selon les directives fournies dans EC, 2001, et en 2.3.4). On peut utiliser de l'eau désionisée pour réduire la salinité des échantillons d'essai. L'échantillon ne doit pas être porté à la température d'essai avant cet ajustement de la salinité. En fait, la température à laquelle se déroule l'ajustement de la salinité devrait approcher celle de l'échantillon au moment de sa réception ou encore de sa sortie du réfrigérateur s'il a été réfrigéré pendant la nuit à 4 ± 2 °C (EC, 2001).

Si on choisit la première méthode, on peut ajouter à l'échantillon non dilué la quantité de sels de mer secs du commerce (p. ex., Instant Ocean^{MC}, Red Sea Salt^{MC}) ou de sels de qualité réactif (p. ex., GP2 modifié; v. Bidwell et Spotte, 1985, ou le tableau 2 dans USEPA, 1994 ou 1995) qui permettra de hausser sa salinité à 30 ± 2 g/kg. Tout échantillon auquel on a ajouté directement des sels secs doit « vieillir » au plus 16-24 h avant son utilisation dans un essai toxicologique (EC, 2001). Lorsqu'il faut faire vieillir un échantillon, la quantité requise de sels doit être ajoutée pendant qu'on mélange l'effluent; par la suite, l'échantillon dont la salinité a été ajustée (à 30 ± 2 g/kg) doit être conservé dans l'obscurité pendant 16-24 h à 4 ± 2 °C, dans un contenant hermétiquement fermé comportant le moins possible d'air (et sans aération). Le pH de l'échantillon devrait être mesuré et consigné avant et après l'ajout de sels, mais avant le vieillissement. Après cette période de vieillissement, il faudrait mélanger l'échantillon d'effluent, porter sa température à celle de l'essai, vérifier et consigner son pH, préparer les concentrations d'essai et mettre l'essai en route (EC, 2001).

Si on choisit la deuxième méthode, la salinité de l'échantillon doit être ajustée à celle de l'essai (30 ± 2 g/kg) par l'ajout de la quantité nécessaire de SHS (et, au besoin, d'eau désionisée). Il faut utiliser à cette fin de la SHS dont la salinité est de 90 ± 1 g/kg. On doit suivre les indications fournies dans EC (2001) et

en 2.3.4 pour préparer la SHS. Si on utilise une SHS dont la salinité est de 90 g/kg pour porter la salinité d'un échantillon d'eau douce à 30 g/kg (v. 3.4 et 4.1.1), la concentration maximale de l'échantillon pouvant être utilisée pour l'essai serait de 67 %.

Les échantillons d'effluent, de lixiviat, d'eau réceptrice, d'élutriat et d'eau produite ou tout autre extrait aqueux d'un sédiment pourraient également être soumis à l'essai sans ajustement de la salinité lorsque l'objet de l'étude consiste à évaluer l'effet total, y compris les écarts de salinité. Il ne faudrait pas oublier que, si un échantillon est essentiellement constitué d'eau douce (salinité de <5 g/kg) ou d'une saumure (p. ex., eau produite), les résultats de l'essai de toxicité indiqueront probablement une salinité peu propice à la fécondation plutôt que la présence d'un ou de plusieurs toxiques dans l'échantillon. Lorsque l'essai porte sur un échantillon à salinité non ajustée, il est conseillé de prévoir une série de témoins de la salinité faisant appel à des concentrations identiques d'eau distillée (v. 4.1.4), de réaliser un deuxième essai avec un échantillon dont la salinité est ajustée ou d'employer ces deux méthodes, pour évaluer l'apport de la salinité à la toxicité.

4.3.3 Oxygène dissous et aération

Avant l'essai, on devrait préaérer l'échantillon ou une aliquote de l'échantillon seulement si sa teneur mesurée en OD indique qu'elle serait en dehors de la plage de 40-100 % de saturation en air dans une ou plusieurs concentrations d'essai. L'aération devrait se faire par introduction d'air comprimé exempt d'huile au moyen d'une conduite d'air et d'un tube en plastique ou en verre jetable à petite ouverture (p. ex., tube capillaire ou pipette à pointe Eppendorf, avec ouverture de ~0,5 mm). L'aération doit se faire à un rythme minimal et contrôlé qui ne devrait pas excéder 100 bulles/min. La préaération doit être limitée à 20 min ou au temps voulu pour obtenir 40 % de saturation en air en deçà de 20 min (ou 100 % en cas de sursaturation

évidente)⁴³. Qu'on ait ou non obtenu 40-100 % de saturation en air dans l'aliquote de l'échantillon ou dans toutes les solutions d'essai comme on pourrait s'y attendre, l'aération doit être interrompue au bout de 20 min et l'essai, être mis en route. Il faut consigner, au début de l'essai, la teneur en OD des aliquotes représentatives des solutions d'essai, dont celle à concentration élevée. Toute préaération doit figurer dans le rapport d'essai, y compris la durée et le taux d'aération (section 9).

Lorsque la teneur en oxygène dans un ou plusieurs récipients est inférieure à 40 % de saturation, l'essai n'est pas valide aux fins de l'évaluation de la toxicité, en soi, de la matière ou de la substance d'essai. L'essai demeurerait cependant valide aux fins de l'évaluation de l'effet total de la matière (p. ex., un effluent) ou de la substance (p. ex., une substance chimique), y compris sa désoxygénation⁴⁴. Dans la plupart des cas, l'utilisation requise d'une eau témoin/de dilution saturée en oxygène donnera lieu à des niveaux d'OD qui ne devraient pas influencer considérablement sur les résultats de l'essai.

⁴³ L'aération peut éliminer les substances chimiques volatiles de la solution ou accroître leur taux d'oxydation et de décomposition en d'autres substances ou matières. Cependant, l'aération d'un échantillon avant l'exposition des gamètes pourrait s'imposer en raison de la demande en oxygène de la substance ou de la matière d'essai (p. ex., en cas de diminution de la teneur en oxygène pendant l'entreposage de l'échantillon). Étant donné les petits volumes des solutions d'essai utilisées dans l'essai sur la fécondation, l'aération des concentrations individuelles n'est pas pratique et on procède à l'aération d'une aliquote de l'échantillon lorsque la situation l'exige.

⁴⁴ La limite inférieure de 40 % de saturation pour l'OD est une valeur arbitraire, parce que des teneurs en oxygène nettement supérieures à cette valeur exercent un stress sur la plupart des organismes aquatiques et ont sans doute un effet sur leurs gamètes. Le stress qu'exerce une faible teneur en oxygène peut interagir avec le stress engendré par les toxiques et être pris en considération dans la mesure de l'effet de l'échantillon, qu'il s'agisse d'un effluent ou de toute autre matière ou substance d'essai. Lorsque l'OD est de >40 % de saturation, toute interaction est, dans la présente méthode d'essai, admise comme faisant partie intégrante de l'effet évalué.

4.3.4 pH

On doit mesurer le pH dans les aliquotes du ou des témoins, aux concentrations élevée, moyenne et faible, avant de procéder à l'essai.

On devrait normalement effectuer les essais toxicologiques à des fins d'évaluation de la conformité ou de *surveillance* sans ajuster le pH. Cependant, lorsque l'échantillon de la matière ou de la substance d'essai fait passer le pH de l'une ou l'autre des solutions d'essai à l'extérieur de la plage de 7,5-8,5, les résultats obtenus pourraient correspondre aux seuls effets imputables au pH⁴⁵. Si on souhaite évaluer un ou des toxiques en soi plutôt que les effets nocifs ou modificateurs du pH, on devrait ajuster le pH des solutions ou de l'échantillon ou effectuer parallèlement un deuxième essai à pH ajusté⁴⁶. Dans ce dernier cas, et selon l'objet de l'étude, on peut ajuster le pH initial de l'échantillon ou de chaque solution d'essai⁴⁷

⁴⁵ On sait que le pH influe sur la reproduction de l'oursin vert (Starr, 1990). Les essais réalisés avec une espèce d'oursin d'Europe ont montré que la viabilité des spermatozoïdes était prolongée lorsque le pH se situait entre 6 et 7,5 plutôt qu'à ~8,0. Cependant, les spermatozoïdes subissent des effets préjudiciables évidents à pH <8,0, comme en fait foi l'augmentation du nombre d'anomalies du développement à pH 7,5 et du nombre d'anomalies mitotiques à pH 7,0 (Pagano et coll., 1985).

⁴⁶ Le fait de ne pas ajuster le pH de l'échantillon ou des solutions s'explique habituellement par la forte influence que peut avoir le pH sur la toxicité d'une substance ou matière d'essai. Par conséquent, dans le cas des concentrations (généralement) faibles des déchets qu'on trouve dans une eau réceptrice après dilution, toute modification du pH naturel de l'eau réceptrice et toute modification concomitante de la toxicité devraient être acceptées comme faisant partie intégrante de la pollution, d'où la recommandation inhabituelle de ne pas ajuster le pH au cours des essais. Cette recommandation doit être observée dans la plupart des cas si le pH des solutions se situe entre 7,5 et 8,5.

⁴⁷ Pour les essais portant sur une substance chimique, un effluent, un lixiviat, un éluatriat ou un extrait aqueux de sédiment qui fera l'objet d'un ajustement du pH, il faudra peut-être ajuster séparément chaque solution d'essai, y compris le témoin. Pour les essais portant sur une eau réceptrice, on ajusterait normalement le pH d'une aliquote de l'échantillon non dilué avant de préparer les concentrations d'essai.

jusqu'à l'obtention d'une valeur équivalant à celle du pH de l'eau témoin/de dilution $\pm 0,5$, avant l'exposition des gamètes. Une autre méthode acceptable pour ce deuxième essai à pH ajusté consiste à ajuster chaque solution d'essai, y compris le témoin, à la hausse jusqu'à ce que le pH se situe entre 7,5 et 8,0 (pour une solution à pH <7,5) ou à la baisse jusqu'à ce que le pH se situe entre 8,0 et 8,5 (pour une solution à pH >8,5). On devrait normalement utiliser pour ces ajustements des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) titrant $\leq 1 N$. Dans certains cas (p. ex., des échantillons d'effluent dont le pH est fortement tamponné), on devra recourir à des titres supérieurs d'acide ou de base⁴⁸.

Dans certains cas, il pourrait être souhaitable de réaliser l'essai le plus sensible pour détecter des substances chimiques toxiques plutôt que d'inclure le pH dans l'effet total d'une substance chimique, d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un éluatriat, ou encore d'un liquide (comme l'eau de porosité) extrait d'un sédiment ou d'une autre matière solide. Il faudrait alors éliminer tout effet associé à un pH bas ou élevé sur la viabilité des gamètes et sur le succès de la fécondation, en ajustant le pH des solutions

⁴⁸ La justification de ces ajustements du pH n'est pas vraiment à l'opposé des raisons précédemment mentionnées pour ne pas ajuster le pH des eaux usées. C'est l'objet de l'essai qui est le facteur déterminant. Certaines substances chimiques et certaines eaux usées entraînent des niveaux de pH ayant des effets létaux ou sublétaux directs, surtout dans les essais de surveillance ou de vérification de la conformité portant sur un effluent non dilué. Il est peu fréquent qu'un responsable d'essai cherche essentiellement à déterminer si un pH extrême est toxique, étant donné que ce pH serait improbable, même après une dilution modérée, dans l'eau de mer réceptrice naturellement tamponnée. Si le pH en soi présentait un intérêt prépondérant, on pourrait procéder à des analyses physicochimiques à peu de frais. Dans bien des cas, un responsable d'essai souhaitera déterminer si des substances toxiques étaient présentes dans des eaux usées et leur détection exigera l'élimination de tout masquage dû à une action toxique du pH. Pour ce faire, il utilisera des échantillons ou des solutions d'essai dont le pH aura été ajusté, en plus de normaliser la température, la salinité et l'OD en fonction de valeurs favorables aux essais toxicologiques.

d'essai, s'il y a lieu, pour qu'il soit dans la plage privilégiée de $8,0 \pm 0,2$ ⁴⁹.

Abernethy et Westlake (1989) fournissent des indications utiles pour l'ajustement du pH. On devrait laisser s'équilibrer, après chaque addition d'acide ou de base, les aliquotes des échantillons ou les solutions d'essai faisant l'objet d'un ajustement du pH. Le temps requis à cette fin dépendra du pouvoir tampon de la solution ou de l'échantillon. Pour les échantillons d'effluent, un délai de 30-60 min est recommandé entre chaque ajustement du pH (Abernethy et Westlake, 1989). Dans un essai avec des échinides, on ajusterait le pH des aliquotes utilisées pour préparer les concentrations d'essai, on consignerait le pH de chaque aliquote (v. 4.4) et on effectuerait l'essai sans procéder à d'autres ajustements.

Lorsque l'essai toxicologique vise à mieux comprendre les caractéristiques des toxiques présents dans la substance ou matière d'essai, l'ajustement du pH est souvent employé parmi d'autres techniques (p. ex., oxydation, filtration, extraction à l'air, ajout d'un chélatant), pour caractériser et préciser la toxicité de l'échantillon. Ces techniques d'IET sont utiles pour déterminer les caractéristiques physicochimiques du ou des toxiques ainsi que la mesure dans laquelle ils peuvent être détoxiqués (USEPA, 1991a, 1991b).

4.4 Observations et mesures

Au terme de l'exposition, on prélève, après mélange⁵⁰, des œufs intacts dans chaque

⁴⁹ Sur les 6 documents d'application dans lesquels sont précisées des exigences en matière de pH pour l'essai sur la fécondation, 5 exigent un pH se situant entre 7,8 et 8,2 (v. annexe D).

⁵⁰ La plupart des œufs se trouvent habituellement dans la partie inférieure du récipient et peuvent y être prélevés. Cependant, les œufs non fécondés forment parfois des amas qui collent aux parois de verre. Le prélèvement excédentaire ou déficitaire de ces œufs pourrait fausser les résultats. Comme mesure correctrice, on peut enlever une bonne partie de la solution surnageante, avec une pipette, pour ensuite mélanger les œufs en plus forte concentration avant de les prélever.

récipient d'essai; on dénombre une quantité égale d'œufs (100-200) provenant de chaque récipient, puis on classe les œufs selon qu'ils sont fécondés ou non (figure 3)⁵¹. La numération s'effectue au moyen d'un microscope grossissant ($\times 100$), de préférence à contraste de phase. Une cellule à numération, comme une cellule de Sedgwick-Rafter, pourrait être utile, mais la numération peut être réalisée à l'aide d'une boîte de Petri gravée. La technique utilisée est importante et peut influencer sur l'exactitude de la numération. La cohérence de l'opération devrait faire l'objet d'une vérification, surtout lorsque plusieurs personnes se partagent la tâche de la numération des œufs.

Le soulèvement de la membrane de fécondation constitue le critère de fécondation. La membrane peut être entièrement ou partiellement soulevée, ou encore être affaissée (v. figure 3), ces 3 caractéristiques étant absentes chez les œufs non fécondés (NCASI, 1991)⁵².

⁵¹ Les œufs de l'oursin violet du Pacifique sont très gros et dotés d'une membrane bien discernable, ce qui facilite la numération. Toutefois, il faut faire très attention lorsqu'on retire les échantillons des flacons, car cette membrane peut se briser et libérer des œufs, ce qui donnera des résultats faussement négatifs.

⁵² Un pH bas ou élevé ou une température élevée peuvent donner lieu à l'apparition de fausses membranes de fécondation. Si ce phénomène semble avoir une incidence sur un échantillon d'essai, on peut préparer un ou plusieurs récipients distincts à concentration élevée et sans conservation, puis vérifier le lendemain si les œufs sont passés à l'état larvaire. On peut également inclure dans l'essai des échantillons « à blanc » (c.-à-d. des récipients contenant les solutions d'essai auxquelles on ajoute des œufs non fécondés, mais pas de sperme) afin de détecter la présence de fausses membranes de fécondation. Les échantillons témoins inclus dans l'essai (c.-à-d. les œufs ajoutés à l'eau témoin/de dilution exempte de sperme; v. 4.1.4) devraient contenir très peu d'œufs fécondés, sinon aucun. Si des échantillons présentent un taux de fécondation de $>10\%$, cela pourrait indiquer qu'il y a eu contamination accidentelle des stocks d'œufs par du sperme, auquel cas les responsables d'essai devraient user de leur jugement professionnel pour déterminer si l'essai s'en trouve invalidé ou non.

4.5 Paramètres et calculs

L'inhibition de la fécondation, évaluée en fonction des témoins, constitue le paramètre biologique de l'essai. On calcule le taux de fécondation pour chaque récipient d'essai.

Dans le cas d'un essai à concentrations multiples, c'est la *concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet précisé* (CI_p) qui constitue le paramètre exigé. Il faut utiliser si possible l'analyse de régression pour le calcul de la CI_p , selon les indications fournies en 4.5.2 ci-dessous et dans EC (2005). Les limites de confiance de 95 % doivent être fournies pour toute CI_p signalée.

4.5.1 Validité de l'essai

L'essai n'est pas valide si le taux de fécondation moyen de toutes les répétitions de l'eau témoin est de <60 % ou de ≥ 98 %⁵³. Aussi, une courbe dose-effet positive et logique devrait être atteinte pour que les résultats soient considérés comme valides – en d'autres termes, l'effet sur

⁵³ Bien que l'objectif de l'essai soit l'obtention d'un taux de fécondation de 80 % chez le témoin et que ce taux puisse être optimal chez ce dernier, le seuil inférieur de validité de l'essai a été établi à ≥ 60 %, étant donné qu'un tel essai peut fournir des renseignements utiles. Le seuil supérieur de validité de l'essai a été établi à <98 % du fait que des taux élevés de fécondation peuvent révéler une surconcentration spermatique et être associés à une perte de sensibilité de l'essai. Dans la première édition de la présente méthode, le seuil inférieur de validité de l'essai était de ≥ 50 %. Il a été porté à ≥ 60 % dans la présente édition parce que celle-ci prévoit la possibilité de provoquer le frai sans acclimatation complète des adultes, étant donné qu'une telle pratique est acceptable à la condition que le critère de validité de l'essai soit satisfait. Avec l'ajout de cette possibilité, ce critère légèrement plus élevé est justifié en regard du taux de fécondation dans l'eau témoin. Par ailleurs, tous les laboratoires du Canada et des États-Unis ayant participé à l'enquête (v. 1.1) ont indiqué qu'ils pouvaient atteindre la plupart du temps un taux de fécondation bien supérieur à 60 % chez le témoin. Pour ce critère, le seuil supérieur de validité de l'essai a été abaissé de <100 % à <98 %, ce qui permet de s'assurer qu'il n'y a pas de surconcentration spermatique.

la fécondation doit généralement devenir plus marqué à des concentrations plus élevées.

Si l'OD était inférieur à 40 % de saturation dans au moins un récipient d'essai, il faudrait considérer que l'essai ne mesure pas la toxicité intrinsèque de la substance ou de la matière d'essai, mais bien son effet total (v. 4.3.3).

4.5.2 Essais à concentrations multiples

L'analyse des données toxicologiques recueillies au moyen d'essais sur la fécondation chez les échinides présente des particularités pour les raisons suivantes :

1. Même si les données sont binomiales par nature (un œuf est soit fécondé, soit non fécondé), elles satisfont souvent à l'hypothèse de normalité du fait qu'il y a 100 répétitions⁵⁴.
2. Selon un des critères de validité de l'essai établi par Environnement Canada, le taux de fécondation (réaction) chez le témoin doit se situer entre ≥ 60 % et <98 %. Il ne sera donc pas de 100 % (conformément au plan d'expérience), et il faut tenir compte de ce fait dans l'analyse des données. En outre, comme cette réaction ne sera pas maximisée, il est possible que la fécondation soit plus élevée (stimulée) à de faibles concentrations de la substance d'essai (réaction hormétique).

⁵⁴ Dans le cas de proportions se situant entre 0,20 et 0,80, on a observé une distribution normale d'environ 80 % des ensembles de données simulées (Zajdlik & Associates Inc., 2010).

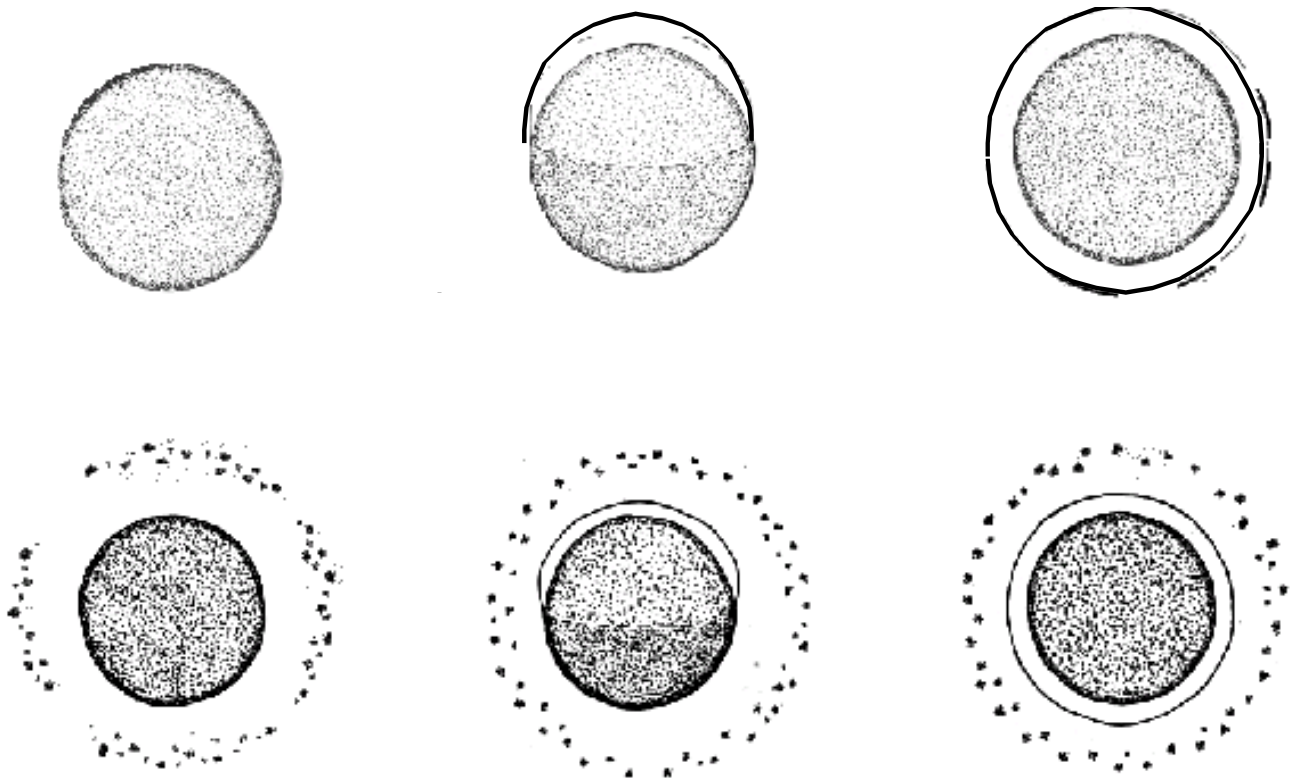


Figure 3. Caractéristiques des œufs fécondés et non fécondés

Dessins linéaires des œufs, tels qu'ils apparaissent sous un microscope à dissection. Les trois dessins de la rangée supérieure sont des œufs d'oursin globuleux, tel l'oursin vert. L'œuf de gauche n'est pas fécondé. Celui du milieu montre une membrane de fécondation partiellement soulevée et est considéré comme fécondé. Celui de droite montre une membrane de fécondation entièrement soulevée. Les œufs de l'oursin violet du Pacifique sont semblables, sauf qu'une membrane hyaline peut être visible entre l'œuf et la membrane de fécondation. Les trois dessins de la rangée inférieure sont des œufs de clypéaste excentrique. L'œuf de gauche n'est pas fécondé, celui du milieu est fécondé, avec membrane partiellement soulevée, et celui de droite est fécondé également, avec membrane entièrement soulevée. La pellicule gélatineuse qui entoure les œufs du clypéaste renferme des granules pigmentaires; elle disparaît habituellement pendant les phases ultérieures de développement des œufs. [Dessins réalisés par M.A. White à partir de lames préparées par McGibbon et Moldan (1986) et des dessins de Kelley Battan, NCASI, Anacortes (WA).]

L'analyse par la méthode des probits constituerait le choix habituel pour les données binomiales des essais à concentrations multiples. Toutefois, les techniques de régression non linéaire (plus précisément, la procédure d'estimation de paramètres) présentent plusieurs avantages par rapport à l'analyse par la méthode des probits⁵⁵, notamment :

- 1) la capacité d'estimer directement la réaction des organismes témoins (la correction d'Abbott⁵⁶ est inutile);
- 2) un plus grand choix de modèles, y compris la possibilité de modéliser l'hormèse⁵⁷, le cas échéant;
- 3) la possibilité d'éviter le rejet injustifié de l'analyse fondée sur le test du khi-deux portant sur l'hétérogénéité⁵⁸.

⁵⁵ L'analyse par la méthode des probits dont il est question ici est le modèle de base bien connu des toxicologues. Ce modèle comporte une pente rectiligne et un point d'intersection où la mortalité chez le témoin est présumée nulle. Des modèles plus évolués incorporent d'autres paramètres permettant d'estimer directement la réaction des organismes témoins, et des interprétations plus élaborées de modèles probits peuvent inclure des modèles faisant appel à une transformation en probits (Zajdlik, comm. pers., 2010; Ives, comm. pers., 2010).

⁵⁶ La correction d'Abbott a été largement utilisée dans l'analyse par la méthode des probits pour corriger les données sur la mortalité chez les organismes témoins. Toutefois, certains chercheurs ont constaté que cette correction peut occasionner un biais dans l'estimation de la mortalité (Zajdlik & Associates Inc., 2010).

⁵⁷ Dans les progiciels les plus courants qu'utilisent les toxicologues, la régression non linéaire comporte au moins une formule normalisée pouvant tenir compte de l'hormèse.

⁵⁸ Dans l'analyse par la méthode des probits, le test du khi-deux portant sur l'hétérogénéité permet de déterminer la pertinence du modèle (EC, 2005). Toutefois, lorsque le nombre de sujets est « élevé » (p. ex., 100 dans le cas de la fécondation chez les échinides), une hétérogénéité élevée est probable. Les procédures d'estimation utilisées dans la régression non linéaire (telle qu'elle est recommandée ici, avec pondération binomiale) atténuent ce problème (Ives, comm. pers., 2008).

La régression non linéaire est habituellement appliquée à des données continues. Cependant, des techniques de pondération peuvent permettre de tenir compte de la nature binomiale des données et de corriger l'hétérogénéité de la variance⁵⁹. La transformation arc-sinus (racine carrée), qui a toujours servi à transformer les données binomiales aux fins de l'analyse, n'est pas recommandée⁶⁰.

Compte tenu de ce qui précède, dans un essai à concentrations multiples, le paramètre statistique exigé pour le taux de fécondation est une CI_p et ses limites de confiance de 95 %, établies au moyen d'une analyse de régression non linéaire.

Il est vivement recommandé de tracer un diagramme initial des données brutes (taux de fécondation) en fonction du logarithme de la concentration afin d'obtenir une représentation visuelle des données, de vérifier si les résultats obtenus sont raisonnables en regard des calculs statistiques ultérieurs et de déterminer s'il existe des valeurs aberrantes. Tout écart important entre le graphique de la CI_p approximative et la CI_p calculée à l'aide d'un programme

⁵⁹ Plus précisément, les estimations du paramètre faisant appel aux moindres carrés itérativement pondérés avec variances binomiales inverses peuvent permettre de prendre en compte la nature binomiale des données. C'est ce qu'on appelle la « pondération binomiale » dans certains progiciels. La pondération est particulièrement importante dans l'estimation des limites de confiance (Carroll et Ruppert, 1988).

⁶⁰ Avant l'accessibilité généralisée des ordinateurs de bureau, la transformation arc-sinus de la racine carrée était utilisée pour transformer les données binomiales afin de satisfaire aux hypothèses expérimentales (variance égale, normalité). Cette méthode présente les inconvénients suivants : elle ne permet pas toujours d'induire une variance homogène et/ou une normalité; elle introduit un biais dû à la transformation (Zajdlik & Associates Inc., 2010). D'un point de vue pragmatique, l'analyse d'ensembles de données-échantillons sur la fécondation chez les échinides a montré qu'une importante déviation de la normalité n'était pas fréquente et que l'application d'une pondération binomiale induit souvent une homogénéité (AquaTox Testing and Consulting Inc., 2009). Par conséquent, il serait rarement nécessaire de procéder à une transformation additionnelle.

informatique doit être expliqué. Le graphique permettrait aussi de déterminer si un lien logique a été obtenu entre la concentration logarithmique (ou, dans certains cas, la concentration) et l'effet, ce qui est souhaitable dans tout essai valide (EC, 2005).

L'analyse de régression constitue la principale méthode statistique à utiliser pour calculer la CI_p , à la condition de satisfaire aux hypothèses ci-dessous (figure 4). Un certain nombre de modèles permettent d'évaluer les données sur la fécondation au moyen d'une analyse de régression. Pour que les méthodes de régression puissent être utilisées, les données doivent satisfaire aux hypothèses de *normalité* et d'*homoscédasticité*. À cette fin, il faut appliquer des techniques de pondération binomiale à toutes les données. Il convient aussi d'examiner les données afin de détecter les valeurs aberrantes à l'aide d'une des méthodes recommandées (v. 10.2 dans EC, 2005). On doit tenter d'ajuster plus d'un modèle aux données. Enfin, il faut choisir le modèle présentant le meilleur ajustement⁶¹ pour déterminer la CI_p et ses limites de confiance de 95 %. Pour déterminer le meilleur ajustement, il est recommandé d'utiliser l'erreur quadratique moyenne résiduelle la plus basse (ou une autre mesure d'ajustement, comme l'AIC ou le BIC⁶²). Les paramètres calculés au moyen d'une

⁶¹ Comme il est indiqué à la sous-section 6.5.8 de EC (2005), les directives actuelles d'Environnement Canada concernant les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité précisent qu'il faut utiliser les cinq modèles suivants d'analyse de régression pour établir la CI_p estimative : modèle linéaire, modèle logistique, modèle de Gompertz, modèle exponentiel et modèle d'*hormèse* (modèle logistique adapté pour tenir compte de l'effet d'hormèse à de faibles concentrations). Le document d'orientation précité fournit également (en 6.5.8 et à l'annexe O) les expressions mathématiques propres à chaque modèle, dont des exemples détaillés associés à un progiciel de statistiques courant. Du fait que les données sur la fécondation chez les échinides sont de nature binomiale, l'analyste peut choisir de mettre l'accent sur les modèles qui tiennent compte de cette caractéristique (p. ex., modèle normal cumulatif, modèle logistique).

⁶² Critère d'information d'Akaike (AIC) ou critère d'information de Bayesian (BIC). Généralement, c'est le modèle ayant l'AIC ou le BIC le plus bas qui est choisi.

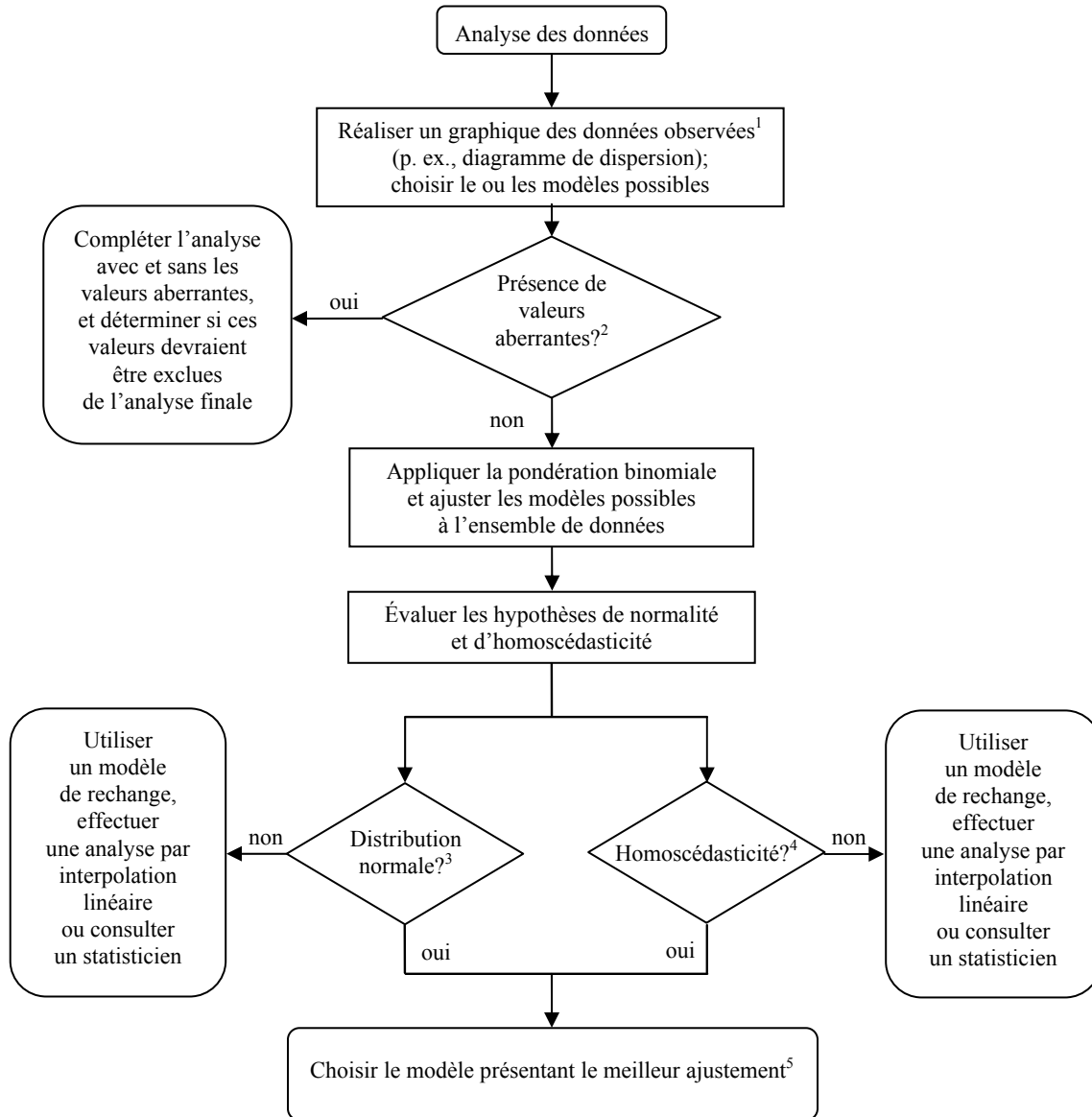
analyse de régression doivent être encadrés par les concentrations d'essai; l'extrapolation des paramètres au-delà de la concentration expérimentale maximale ne constitue pas une pratique acceptable.

Dans le cas de certaines matières ou substances très toxiques, il est possible que le taux de fécondation soit nul ou quasi nul⁶³ à une ou plus d'une concentration. Les résultats connexes à la ou aux concentrations d'essai élevées n'apportent alors aucune autre information quant à la réaction des organismes, et les résultats nuls répétitifs peuvent influencer sur les hypothèses de régression de la *normalité* et de l'*homoscédasticité*⁶⁴. Les données sur la concentration d'essai la plus faible associée à un taux de fécondation nul ou quasi nul sont conservées dans l'ensemble de données, mais celles sur la ou les concentrations élevées suivantes doivent en être supprimées avant les analyses de régression.

La possibilité de décrire mathématiquement l'*hormèse* (c.-à-d. une stimulation ou une réaction « supérieure à celle du témoin » ne se produisant que lors d'une exposition à des concentrations faibles) dans la courbe dose-réponse a été intégrée dans les modèles de régression récents (v. 10.3 dans EC, 2005). Les données relatives à une *hormèse* peuvent être saisies directement puisque tous les points de données peuvent être pris en compte et incorporés dans le modèle; il n'y a aucun échantillonnage des points de données indiquant une réponse hormétique.

⁶³ Dans un tel essai, on entend par « quasi nul » un taux de fécondation de ≤ 2 %, calculé comme étant la moyenne des traitements. Cette valeur a été établie empiriquement à partir de l'examen d'ensembles de données-échantillons.

⁶⁴ Dans la pratique, l'application d'une pondération binomiale peut réduire au minimum les problèmes que soulèvent les hypothèses expérimentales et qui sont associés aux valeurs nulles répétitives à des concentrations élevées. Toutefois, par mesure de précaution, il faut supprimer ces données non informatives.



¹ Si des valeurs nulles ou quasi nulles sont enregistrées à des concentrations élevées, voir les conseils dans le texte principal.

² Les valeurs aberrantes peuvent être évaluées à d'autres moments de l'analyse (p. ex., graphique sur les valeurs résiduelles).

³ Utiliser le test de Shapiro-Wilks et les graphiques de probabilité normale.

⁴ Utiliser le test de Levene et examiner les graphiques sur les valeurs résiduelles.

⁵ Utiliser l'erreur quadratique moyenne résiduelle la plus basse ou une autre mesure d'ajustement (p. ex., AIC ou BIC).

Figure 4. Organigramme général de l'analyse statistique des données d'un essai à concentrations multiples en vue d'établir une CI_p

Si les données ne se prêtent pas à une analyse de régression (à savoir lorsque les hypothèses de *normalité* et d'*homoscédasticité* ne peuvent être satisfaites), on peut avoir recours à une interpolation linéaire (p. ex., le programme ICPIN; v. 6.4.3 dans EC, 2005) pour calculer une CI_p . Dans ce cas, on utiliserait les valeurs logarithmiques des données sur la concentration, mais sans appliquer une pondération binomiale. Si les données révèlent une *hormèse* et que le programme ICPIN est utilisé, les réactions des organismes témoins doivent être prises en compte pour les concentrations donnant lieu à une *hormèse* (option 4, sous-section 10.3.3, EC, 2005).

Pour chaque concentration d'essai, y compris le ou les traitements témoins, le pourcentage moyen d'œufs fécondés (\pm ET), tel qu'il est établi à la fin de l'essai, doit être consigné.

4.5.3 Essais à concentration unique

Le plan d'expérience le plus utilisé pour mesurer la fécondation chez les échinides est un essai à concentrations multiples. Cependant, si le responsable de l'essai souhaite procéder à un essai à concentration unique (p. ex., pour évaluer des sédiments provenant de différents lieux d'échantillonnage), la méthode d'essai par contact [décrite dans *Méthode d'essai biologique : Méthode de référence pour déterminer la toxicité sublétales chez des embryons/larves d'échinides (oursins globuleux ou oursins plats) en contact avec un sédiment* (en préparation – titre provisoire)] pourrait mieux convenir, étant donné qu'un sédiment fait partie du plan d'expérience.

Dans un essai à concentration unique, on compare la réaction des organismes à une ou plusieurs solutions d'essai à la concentration maximale (provenant, p. ex., de sites multiples) à celle des organismes témoins. L'analyse des données toxicologiques recueillies au moyen d'essais sur la fécondation chez les échinides présente des particularités. En effet, même si les données sont binomiales par nature (un œuf est soit fécondé, soit non fécondé), elles satisfont souvent à l'hypothèse de normalité du fait qu'il

y a 100 répétitions⁶⁵. En conséquence, les recommandations formulées ici privilégient les techniques connexes aux données quantitatives (continues).

Si le taux de fécondation est évalué en regard d'une seule solution d'essai et d'un témoin, le test-*t*⁶⁶ convient habituellement. Lorsque plus d'un site expérimental est à l'étude et que le responsable de l'essai souhaite comparer de nombreux traitements avec le témoin ou comparer les traitements entre eux, il peut avoir recours à divers tests comparatifs (v. 3.3 dans EC, 2005). Le choix du test à utiliser est fonction des éléments suivants :

- (i) le type de comparaison à établir (p. ex., une série complète de comparaisons par paire entre tous les sites ou une comparaison des données propres à chaque emplacement avec celles du témoin seulement);
- (ii) un gradient dans la réponse chimique et/ou biologique est prévu;
- (iii) les hypothèses de *normalité* et d'*homoscédasticité* sont satisfaites.

Dans la plupart des cas, il est inutile d'appliquer la correction d'Abbott au taux de fécondation⁶⁷.

⁶⁵ Dans le cas de proportions se situant entre 0,20 et 0,80, on a observé une distribution normale d'environ 80 % des ensembles de données simulées (Zajdlik & Associates Inc., 2010).

⁶⁶ En principe, le test-*t* suppose une distribution *t* et des variances égales dans les deux groupes. On trouvera dans EC (2005) une description des tests de distribution et de variances égales, de même que les solutions de rechange recommandées dans le cas de variances inégales.

⁶⁷ Le recours à la formule d'Abbott n'est recommandé que dans les cas suivants : (i) l'écart dans le taux de fécondation entre les sites est attribuable à un effet autre que celui du site lui-même (p. ex., santé des organismes, mauvaises conditions d'exposition); (ii) les valeurs absolues du taux de fécondation pour chaque traitement sont exigées (plutôt que l'écart dans le taux de fécondation) (Zajdlik & Associates Inc., 2010). Si les laboratoires se conforment à toutes les exigences quant à la santé des organismes et aux conditions applicables à cet essai normalisé, on suppose que la situation décrite en (i) ne s'applique pas. Si le responsable de l'essai s'intéresse à l'écart entre les taux de fécondation d'un site à l'autre, on suppose que l'exigence énoncée en (ii) ne s'applique pas.

Pour chaque solution ou traitement d'essai, y compris le ou les traitements témoins, le pourcentage moyen d'œufs fécondés (\pm ET), tel qu'il est établi à la fin de l'essai, doit être consigné.

4.6 Toxiques de référence

Il faut utiliser couramment un ou des *toxiques de référence* pour évaluer, dans des conditions d'essai normalisées, la sensibilité relative des *lots* de gamètes ainsi que la précision et la fiabilité des données obtenues en laboratoire pour le ou les toxiques de référence choisis (EC, 1990d).

Dans le cas des adultes acclimatés graduellement aux conditions d'essai et maintenus au laboratoire pendant une période prolongée (>3 jours), la sensibilité des gamètes à un ou des toxiques de référence doit être déterminée à l'aide d'un *essai sur le ou les toxiques de référence* mené dans les 14 jours précédant ou suivant la date de l'essai définitif. On peut aussi choisir d'effectuer ces deux essais en parallèle, auquel cas il faudra utiliser le même *lot* de gamètes dans les deux essais.

Si la collecte des gamètes a lieu la journée de l'arrivée des adultes au laboratoire ou dans les 3 jours qui suivent, on doit procéder à un essai sur le ou les toxiques de référence avec une fraction des gamètes qui seront utilisés dans l'essai définitif afin de déterminer leur tolérance à ce ou ces toxiques, dans les mêmes conditions d'essai que celles applicables à l'échantillon ou aux échantillons d'essai et en même temps que l'essai toxicologique proprement dit.

Les critères sur lesquels se fondent les recommandations relatives aux toxiques de référence sont les suivants :

- la disponibilité de la substance à l'état pur;
- la durée utile (stabilité) de la substance à long terme;
- la solubilité élevée dans l'eau;

- la stabilité en solution aqueuse;
- l'innocuité relative de la substance pour ses utilisateurs;
- la facilité avec laquelle la substance peut être dosée avec précision;
- une courbe dose-réponse satisfaisante pour les gamètes d'échinides;
- l'incidence connue du pH sur la toxicité de la substance utilisée dans l'essai;
- l'incidence connue de la salinité sur la toxicité de la substance utilisée dans l'essai.

Pour l'essai, on recommande le cuivre comme toxique de référence⁶⁸. On doit évaluer,

⁶⁸ Les différents groupes qui effectuent des essais sur la fécondation chez les échinides ne semblent pas privilégier un toxique de référence; la plupart du temps, ils ne mentionnent pas le toxique en question ou négligent le sujet (v. annexe D). Aux États-Unis, deux groupes ont utilisé le cuivre et l'azoture de sodium. Les laboratoires provinciaux de la Colombie-Britannique ont aussi choisi ces deux substances, ainsi que l'argent (van Aggelen, comm. pers., 1992). Pour le cuivre, on a signalé des CI_{50} de ~20-26 μ g Cu/L et des CV de 23-46 % (Chapman, comm. pers., 1992b). On dispose d'une information plus limitée sur l'azoture de sodium, qui ne figure pas dans le guide sur les toxiques de référence (EC, 1990d). Les *solutions mères* d'azoture de sodium se conservent pendant ≤ 3 mois.

On peut expérimenter d'autres substances chimiques comme toxiques de référence. Le GITA (1991) a constaté, pour le cadmium, une concentration seuil d'effet de 18 μ g Cd/L pour l'oursin vert et l'oursin blanc. Le cadmium n'est probablement pas la substance chimique la plus souhaitable pour un usage normalisé, étant donné qu'il s'agit d'un toxique dangereux et bioaccumulatif. De plus, on a signalé que le cadmium est associé à une forte proportion d'œufs présentant des anomalies et difficiles à classer au moment de la numération (van Aggelen, comm. pers., 1992). Le phénol de qualité réactif peut être utile, étant donné qu'il s'agit d'une substance chimique organique pouvant servir de complément au cuivre inorganique, sans compter qu'il est recommandé pour d'autres essais toxicologiques d'Environnement Canada (EC, 1990a, 1990b, 1992a, 1992b). On devrait préparer les solutions mères de phénol la journée même de l'utilisation. On a déjà utilisé le dodécyl sulfate de sodium dans des essais sur la fécondation, mais cette substance a des caractéristiques non souhaitables comme toxique de référence (EC, 1990d).

conformément aux méthodes et conditions énoncées dans le présent document, la sensibilité des gamètes au moyen d'essais visant à déterminer la CI_p du cuivre. Pour tous les essais à concentrations multiples décrits ici, on doit faire appel à l'analyse de régression pour calculer la CI_p du toxique de référence et ses limites de confiance de 95 %, si possible, selon les indications fournies en 4.5.2 et dans EC (2005). On devrait employer du sulfate de cuivre ou du chlorure de cuivre pour préparer les *solutions mères*, qui devraient être acides (pH 3-4). Ces solutions peuvent être utilisées immédiatement ou entreposées dans l'obscurité à 4 ± 2 °C pendant plusieurs semaines. La teneur en cuivre devrait être exprimée en mg Cu^{++}/L .

Pour les solutions témoins/de dilution, on utilise de l'eau de mer naturelle ou reconstituée. Pour assurer un degré élevé de normalisation de l'essai toxicologique de référence, on devrait ajuster la salinité de l'eau témoin/de dilution en fonction d'une valeur constante favorable aux gamètes, soit une plage de 28-32 g/kg, de préférence 30 g/kg.

On devrait mesurer, au moyen des méthodes d'analyse chimique appropriées (p. ex., APHA et coll., 1989, 2005), les concentrations du toxique de référence dans toutes les solutions mères. Au moment de préparer les solutions d'essai, il faudrait prélever des aliquotes du témoin et des concentrations faible, moyenne et élevée pour les analyser immédiatement ou les entreposer aux fins d'une analyse ultérieure, dans l'éventualité d'une CI_p se situant à l'extérieur des *limites de la zone de confiance*. Le cas échéant, les aliquotes doivent être entreposées dans l'obscurité à 4 ± 2 °C. Les solutions de cuivre devraient subir un traitement de conservation avant d'être entreposées (APHA et coll., 1989, 2005). On devrait procéder à l'analyse chimique des aliquotes entreposées à cette fin dès que l'essai toxicologique est terminé. Le calcul de la CI_p devrait se fonder sur les concentrations mesurées lorsqu'elles diffèrent suffisamment (≥ 20 %) des concentrations nominales et

lorsque la précision des analyses chimiques est satisfaisante.

Une fois qu'on dispose d'un nombre suffisant de données (EC, 1990d), une *carte de contrôle* doit être établie et mise à jour pour chaque toxique de référence utilisé. On porte les CI_p successives sur le graphique et on les examine pour déterminer si les résultats se situent dans l'intervalle de ± 2 ET des valeurs obtenues dans les essais précédents. Pour chaque CI_p , on recalcule la *moyenne géométrique* ainsi que les *limites de la zone de confiance* supérieure et inférieure (± 2 ET, calculé en fonction des données logarithmiques)⁶⁹ jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (USEPA, 1989, 2002; EC, 1990d).

Si une CI_p particulière tombe à l'extérieur de ces limites, il convient de mettre en doute la sensibilité des gamètes, de même que l'exécution et la précision de l'essai. Comme cette situation peut se produire dans 5 % des cas par le simple jeu du hasard, l'obtention d'une seule valeur aberrante de la CI_p n'est pas nécessairement un signe de sensibilité anormale du *lot* de gamètes ou de précision insatisfaisante des données toxicologiques; c'est seulement un avertissement. Si cela se produisait, on devrait procéder à un examen approfondi de toutes les conditions de maintien des organismes et des conditions d'essai.

Il pourrait être indiqué, dans ce cas, de comparer le succès de la fécondation pour différents rapports spermatozoïdes:œufs en

⁶⁹ On doit se servir du logarithme de concentration (c.-à-d. la CI_p) dans tous les calculs de moyennes et d'écart types ainsi que dans toutes les constructions graphiques. Cette pratique reflète simplement une adhésion à l'hypothèse selon laquelle chaque CI_p a été estimée en fonction des logarithmes des concentrations. On peut construire la carte de contrôle en reportant les valeurs logarithmiques de la moyenne et de ± 2 ET sur du papier graphique à échelle arithmétique, ou en reportant les valeurs arithmétiques sur un papier à échelle logarithmique ou semi-logarithmique. S'il est démontré que les CI_p n'obéissent pas à une distribution log-normale, il pourrait s'avérer préférable d'opter pour une moyenne et un écart type arithmétiques.

fonction des valeurs déjà obtenues. Cette évaluation devrait fournir une indication utile de la viabilité décroissante des gamètes, comme ce pourrait être le cas à la fin de la période du frai. Selon les résultats, il pourrait être nécessaire de reprendre l'essai toxicologique de référence avec de nouveaux gamètes et/ou un nouveau *lot* d'adultes avant d'entreprendre d'autres essais de toxicité.

Le fait que les résultats soient tous à l'intérieur des limites de la zone de confiance n'est pas nécessairement un gage de la cohérence des résultats obtenus par le laboratoire. Des données historiques extrêmement variables pour un toxique de référence donné élargiraient ces limites à un point tel qu'un nouveau résultat d'essai pourrait se trouver à l'intérieur des limites, tout en représentant une variation indésirable dans les résultats de l'essai. On trouvera des indications sur la variation raisonnable des données sur les toxiques de référence (c.-à-d. les limites de la zone de confiance d'une carte de contrôle) à la sous-section 2.8.1 et à l'annexe F de EC (2005).

Une CI_p qui tombe à l'extérieur des limites de contrôle (moyenne ± 3 ET) révèle presque à

coup sûr que l'essai est inacceptable et qu'il devrait être repris après un examen attentif de tous ses aspects. Si les paramètres se situent entre les limites de contrôle et les limites de la zone de confiance plus de 5 % du temps, cela révélerait une détérioration de la précision. Encore là, l'essai le plus récent devrait être repris après un examen attentif des modes opératoires, des conditions et des calculs.

4.7 Considérations juridiques

Il faut veiller à l'admissibilité, devant un tribunal, des échantillons prélevés et analysés dans le dessein d'engager des poursuites. À cette fin, les échantillons doivent être représentatifs de la matière ou de la substance échantillonnée, ne pas être contaminés par des substances ou matières étrangères et être identifiables quant à la date, à l'heure et au lieu du prélèvement; il faut aussi que leur chaîne de conservation soit documentée et qu'ils aient été analysés le plus tôt possible après le prélèvement. Les responsables de l'exécution de l'essai et de la transmission des résultats doivent assurer la continuité de la preuve aux fins de la procédure judiciaire (McCaffrey, 1979) et l'intégrité des résultats de l'essai.

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

La présente section renferme des instructions particulières relatives aux essais sur des substances chimiques, qui s'ajoutent aux procédures exposées à la section 4.

5.1 Propriétés, étiquetage et entreposage de l'échantillon

On devrait obtenir des renseignements sur les propriétés de la substance, de la formulation ou du mélange chimique soumis à l'essai, notamment la concentration des principaux ingrédients, la solubilité dans l'eau, la tension de vapeur, la stabilité chimique, les constantes de dissociation, le coefficient de partage *n*-octanol-eau et la biodégradabilité. Il faudrait consulter la fiche signalétique de la ou des substances, si elle existe. Lorsque la solubilité dans l'eau soulève des doutes ou des difficultés, il faudrait recueillir et consigner l'information sur les modes opératoires admissibles employés antérieurement pour la préparation des solutions aqueuses de la ou des substances et/ou procéder à un essai pour déterminer la solubilité de la ou des substances dans l'eau d'essai⁷⁰. Il faudrait également recueillir et consigner les autres renseignements disponibles, notamment la formule développée, le degré de pureté, la nature et le *pourcentage* des impuretés importantes et des additifs, les précautions entourant la manipulation et les estimations de la toxicité de la substance pour les humains et/ou les organismes aquatiques⁷¹. On devrait aussi connaître une méthode d'analyse

⁷⁰ L'information concernant la solubilité et la stabilité de la ou des substances dans l'eau de mer et dans l'eau douce sera également utile dans l'interprétation des résultats de l'essai.

⁷¹ La connaissance des propriétés de la ou des substances permettra de mieux déterminer les précautions à prendre et les exigences applicables pendant la manipulation et l'essai (p. ex., ventilation des installations d'essai, utilisation d'un solvant).

acceptable pour la ou les substances chimiques en milieu aqueux, aux concentrations prévues pour l'essai, et disposer de données sur la précision et la justesse de l'analyse.

Dès la réception de la substance chimique, on doit fermer hermétiquement les contenants et les coder ou les étiqueter. On devrait indiquer sur l'étiquette au moins le nom de la substance, le fournisseur et la date de réception. Les conditions d'entreposage dépendent des propriétés de la substance et comportent souvent des prescriptions en matière de température et de protection contre la lumière. On devrait respecter les pratiques normalisées de manipulation et d'entreposage des substances chimiques.

5.2 Préparation des solutions d'essai

Dans la mesure du possible, on devrait préparer les solutions d'essai de la substance chimique en ajoutant des aliquotes d'une solution mère constituée d'eau témoin/de dilution⁷². Lorsque la solution mère est composée d'eau désionisée, d'eau distillée ou d'eau douce, on devrait ajouter au besoin des sels de mer secs du commerce, des sels de qualité réactif ou de la SHS (90 ± 1 g/kg) pour ajuster la salinité de chaque solution d'essai à la plage de salinité voulue (c.-à-d. 30 ± 2 g/kg). Pour les échantillons aqueux (p. ex., formulations de substances chimiques dans l'eau), les solutions d'essai peuvent aussi être préparées en ajoutant les quantités appropriées de sels de mer secs du commerce, de sels de qualité réactif ou de SHS (ou de l'eau désionisée au besoin) à

⁷² La concentration et la stabilité de la substance dans la solution mère devraient être déterminées avant l'essai. Les solutions mères sensibles à la photolyse devraient être protégées contre la lumière. Dans le cas des solutions instables, il faut en préparer de nouvelles au fur et à mesure des besoins.

l'échantillon ou à chaque solution d'essai (v. 2.3.4 et 4.3.2). Dans le cas de solutions fortes ou de gros volumes, des quantités mesurées (avec une balance de précision) de la substance chimique peuvent être ajoutées à l'eau témoin/de dilution pour obtenir les teneurs nominales aux fins de l'essai. Les concentrations d'essai nominales doivent être préparées et consignées en tenant compte de l'ajustement de la salinité. Tout essai dans lequel de la SHS a été ajoutée à l'échantillon ou aux solutions d'essai doit comprendre une série de témoins constitués uniquement de SHS et d'eau désionisée (c.-à-d. des *témoins de la SHS*) (v. 4.1.1). De même, si des sels de mer secs du commerce ou des sels de qualité réactif et de l'eau désionisée ont été ajoutés à l'échantillon ou aux solutions d'essai, on doit prévoir une série de témoins (c.-à-d. des *témoins des sels*) constituées uniquement de ces sels et de cette eau (v. 4.1.1).

Pour les substances chimiques qui ne se dissolvent pas facilement dans l'eau, des solutions mères peuvent être préparées au moyen de la méthode de la colonne génératrice (Billington et coll., 1988; Shiu et coll., 1988) ou, ce qui est moins souhaitable, par dispersion ultrasonique⁷³. On ne devrait pas utiliser de solvants organiques, d'*émulsifiants* ou de *dispersants* pour accroître la solubilité de la substance chimique, sauf lorsque ces substances pourraient être formulées avec la substance d'essai dans son utilisation commerciale normale. Le cas échéant, on doit préparer une solution témoin supplémentaire renfermant la même concentration d'agent solubilisant que la solution la plus concentrée de la substance d'essai. Ces agents devraient être utilisés parcimonieusement, leur concentration ne devant pas dépasser 0,1 mL/L dans toute solution d'essai. Dans le cas des solvants, les

substances à privilégier (USEPA, 1985; ASTM, 1990) sont le tryéthylèneglycol et le diméthylformamide. On pourrait aussi utiliser le méthanol, l'éthanol et l'acétone, mais ces substances sont plus volatiles.

5.3 Eau témoin/de dilution

L'eau témoin/de dilution peut être de l'eau de mer reconstituée (artificielle), de l'eau de mer naturelle « non contaminée » du laboratoire ou un échantillon d'une eau réceptrice lorsque l'essai concerne un endroit précis. Le choix de l'eau témoin/de dilution dépend de l'objet de l'essai (v. 3.4).

On devrait utiliser de l'eau de mer reconstituée quand un degré élevé de normalisation est nécessaire (p. ex., pour mesurer la toxicité d'une substance chimique par rapport à des valeurs obtenues ailleurs pour cette substance ou d'autres substances). La salinité de l'eau témoin/de dilution utilisée pour ces essais comparatifs devrait être la même pour tous les essais et servir pour toutes les dilutions; elle devrait être de 28-32 g/kg. De plus, l'écart par rapport à la salinité des témoins devrait être de ≤ 1 g/kg.

Lorsque l'essai a pour objet d'évaluer l'effet toxique d'une substance chimique sur une eau réceptrice donnée, on pourrait prélever un ou des échantillons de cette eau dans un endroit non contaminé par la substance en question et s'en servir comme eau témoin/de dilution. Il pourrait s'agir, par exemple, d'évaluer l'effet toxique, sur une masse d'eau donnée, d'un déversement (réel ou potentiel) ou d'un épandage intentionnel d'une substance chimique (p. ex., la pulvérisation d'un pesticide). Si on doit utiliser un échantillon d'eau réceptrice comme eau témoin/de dilution, une solution témoin distincte doit être préparée avec l'eau témoin/de dilution qui est normalement utilisée pour l'essai sur la fécondation chez les échinides et qui permet de réaliser des essais valides sur une base régulière (v. 4.5.1).

⁷³ La dispersion ultrasonique est moins souhaitable, car elle peut produire des gouttelettes non uniformes et de tailles différentes, dont certaines peuvent migrer vers la surface du liquide ou donner lieu à des variations de la biodisponibilité de la substance chimique et, par conséquent, de sa toxicité.

L'eau de mer naturelle non contaminée ou l'eau de mer reconstituée du laboratoire peut également être utilisée pour évaluer l'effet toxique d'une substance sur une eau réceptrice donnée, en particulier en présence d'une toxicité interférente dans cette eau réceptrice ou lorsque des contraintes d'ordre logistique empêchent le prélèvement et l'utilisation d'échantillons de cette eau (v. 4.1.1). L'eau de mer du laboratoire dans laquelle sont maintenus les adultes peut aussi servir dans d'autres situations (p. ex., évaluation préalable ou intralaboratoire de la toxicité d'une substance chimique).

Pour mesurer l'effet de la salinité sur la toxicité de la substance chimique à l'étude, on devrait réaliser des essais distincts et parallèles à ≥ 2 salinités différentes. Cependant, il ne faut pas oublier qu'une salinité qui se situe hors de la plage de 28-32 g/kg peut influencer sur le succès de la fécondation⁷⁴. Pour ces essais, l'eau témoin/de dilution devrait provenir d'une même source, qu'il s'agisse d'eau de mer reconstituée (v. 2.3.4) ou d'eau de mer naturelle dont la salinité a été ajustée au besoin avec de la SHS, des sels secs, de l'eau désionisée, de l'eau distillée ou de l'eau douce non contaminée.

5.4 Observations et mesures

En plus des observations sur la toxicité décrites en 4.4, il faut procéder à d'autres observations et mesures dans les essais sur des substances chimiques.

Pendant la préparation, on devrait examiner chaque solution d'essai afin de détecter la présence de substances chimiques et d'observer leur évolution (p. ex., odeur, couleur et opacité, *précipitation* ou *floculation*). Toute observation devrait être consignée.

⁷⁴ Pour évaluer l'effet de la salinité sur la toxicité d'une substance lorsque cette salinité se situe en dehors de la plage restreinte favorable aux gamètes, une autre forme d'essai avec des organismes *euryhalins* pourrait donner de meilleurs résultats que l'essai sur la fécondation.

Il est souhaitable et recommandé d'analyser des aliquotes des solutions d'essai afin de déterminer les teneurs en substances chimiques auxquelles les gamètes sont exposés, ces analyses englobant au moins les concentrations élevée, moyenne et faible ainsi que le ou les témoins⁷⁵.

Tous les échantillons devraient être conservés, entreposés et analysés selon des méthodes éprouvées. Les méthodes d'analyse doivent être assorties de limites de détection acceptables permettant d'établir la concentration de la substance chimique visée en solution aqueuse. Dans tous les essais au cours desquels on mesure les concentrations, la toxicité devrait être calculée et exprimée en fonction de ces dernières, sauf s'il y a lieu de croire que les analyses chimiques ne sont pas exactes. Pendant les calculs, chaque solution d'essai devrait être caractérisée d'après la moyenne géométrique de la concentration mesurée à laquelle les gamètes sont exposés.

5.5 Paramètre de l'essai et calculs

La CI_p est le paramètre recommandé pour tout essai à concentrations multiples (v. 4.5).

Si on utilise un témoin du solvant, l'essai n'est pas valide lorsque le succès de la fécondation y est nettement moins élevé que dans le témoin contenant seulement de l'eau.

⁷⁵ Il n'est pas nécessaire d'effectuer ces analyses dans tous les cas, en raison des limites d'analyse, du coût ou des résultats antérieurs confirmant la stabilité de la substance dans des conditions similaires à celles de l'essai. Les analyses chimiques sont particulièrement recommandées lorsque les solutions d'essai sont aérées, que la substance d'essai est volatile ou insoluble ou encore qu'elle précipite et lorsqu'on sait qu'il y a sorption de cette substance sur le ou les matériaux des récipients d'essai (USEPA, 1985). Dans certains cas, on peut exiger la mesure des concentrations de la substance chimique dans les solutions d'essai (p. ex., aux fins de l'homologation des pesticides).

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

La présente section renferme des instructions particulières sur le prélèvement et la préparation d'échantillons d'effluent, de lixiviat et d'élutriat et sur leur emploi dans les essais. Ces instructions s'ajoutent aux procédures exposées à la section 4.

6.1 Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons

Les contenants utilisés pour le transport et l'entreposage des échantillons d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat doivent être fabriqués d'un matériau non toxique. Sont recommandés les contenants souples en polyéthylène ou en polypropylène servant au transport de l'eau potable (p. ex., Reliance^{MC}). Leur volume peut se contracter pour s'adapter à l'intérieur d'une glacière, et le volume d'air intérieur peut être maintenu au minimum lorsqu'on y prélève des fractions de l'échantillon au laboratoire en vue d'essais toxicologiques ou d'analyses chimiques. Les contenants doivent être soit neufs, soit nettoyés à fond et rincés à l'eau non contaminée. Il faudrait aussi les rincer avec l'échantillon à prélever et les remplir complètement de façon à réduire au minimum le volume d'air libre.

La plupart des essais portant sur un effluent, un lixiviat ou un élutriat seront exécutés « hors site » dans des conditions contrôlées de laboratoire. L'essai devrait être entrepris dans les 24 h suivant le prélèvement, si possible, mais pas plus de 3 jours après. Les échantillons de sédiment ou d'un autre matière solide prélevés en vue de l'extraction puis d'un essai sur l'élutriat devraient aussi être soumis à l'essai le plus tôt possible. L'extraction devrait commencer dans les 2 semaines suivant le prélèvement (idéalement dans la première semaine) et les essais doivent être entrepris au plus tard 6 semaines après le prélèvement

(EC, 1994). On devrait se conformer aux modes opératoires décrits dans EC (1994) pour la préparation des élutriats. Les essais portant sur des élutriats doivent commencer dans les 3 jours suivant leur préparation ou dans les délais indiqués dans un règlement ou un *protocole*.

En général, un échantillon de 2 L convient à un essai à concentrations multiples réalisé hors site, aux analyses chimiques courantes et à tout ajustement ou reprise d'essai. Les essais à concentration unique exigent un volume moindre (v. 4.5.4). Dès le prélèvement, il faut remplir, fermer hermétiquement et étiqueter ou coder chaque contenant. On devrait indiquer sur l'étiquette au moins le type d'échantillon, son origine, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom de la ou des personnes ayant procédé au prélèvement. On ne devrait pas soumettre à des essais les échantillons arrivant au laboratoire non étiquetés ou non codés, ni utiliser pour les essais courants les échantillons parvenant au laboratoire dans des contenants partiellement remplis, car les toxiques volatils peuvent passer dans le volume d'air. Cependant, s'il sait que la volatilité ne fait pas problème, le responsable de l'essai peut, à son gré, soumettre ces échantillons à des essais.

On doit s'efforcer de garder les échantillons d'effluent ou de lixiviat au frais (1-7 °C, de préférence 4 ± 2 °C) durant le transport. Dès le prélèvement, il faut refroidir à 1-7 °C les échantillons tièdes (>7 °C) à l'aide de glace hydrique (et non de glace sèche) ou de sachets réfrigérants. Au besoin, on doit ajouter dans le contenant de transport des quantités généreuses de glace hydrique, des sachets réfrigérants ou d'autres moyens de réfrigération, afin de maintenir la température de l'échantillon dans la plage de 1-7 °C durant le transport. Les échantillons ne doivent pas geler pendant le transport ou l'entreposage.

Il faut mesurer et consigner la température de l'échantillon dès son arrivée au laboratoire. On peut amener à la température d'essai, immédiatement ou pendant la nuit, une aliquote d'effluent ou de lixiviat dont on a besoin à cette fin et l'utiliser pour l'essai. On doit garder dans l'obscurité le reste de l'échantillon destiné à des essais ultérieurs, dans des contenants fermés hermétiquement, sans espace libre, à 4 ± 2 °C.

À moins d'indication contraire, les éluviats et les échantillons destinés à l'extraction en milieu aqueux puis à l'essai toxicologique devraient être transportés et entreposés dans les conditions précisées ci-dessus.

6.2 Préparation des solutions d'essai

Il faut agiter soigneusement, juste avant de le vider, le contenant dans lequel l'échantillon a été prélevé pour assurer la remise en suspension des matières décantables. Les sous-échantillons (c.-à-d. les échantillons répartis dans ≥ 2 récipients) doivent être mélangés afin d'assurer leur homogénéité. La teneur en OD et le pH de chaque échantillon doivent être mesurés juste avant l'utilisation. Au besoin, il faudrait pré-aérer l'échantillon (v. 4.3.3) avant de préparer les solutions d'essai et de les répartir dans les enceintes d'essai.

La salinité de chaque échantillon devrait être mesurée avant de commencer l'essai. Si elle est à l'extérieur de la plage considérée acceptable pour l'essai (soit 28-32 g/kg), la salinité de l'échantillon ou de chaque solution d'essai devrait être ajustée en conséquence avec de la SHS naturelle ou artificielle, des sels de mer secs, des sels de qualité réactif (v. 2.3.4 et 4.3.2) ou de l'eau désionisée seulement. Les concentrations nominales d'essai doivent être préparées et consignées en tenant compte de tout ajustement de la salinité.

Normalement, il n'est ni nécessaire ni recommandé de filtrer les échantillons. Cependant, si un échantillon d'effluent ou de lixiviat renferme des débris ou des organismes indigènes qui pourraient être confondus avec les

gamètes ou les œufs fécondés ou les attaquer, l'échantillon doit être filtré à travers un tamis à pores de 60 μm avant d'être utilisé (USEPA, 1994). Cette filtration pourrait arrêter une partie des solides en suspension ou décantables, caractéristiques de l'échantillon, qui risquent autrement de contribuer à une partie de la toxicité ou de la modifier. Par exemple, les teneurs élevées en solides biologiques de certains types d'eaux usées traitées peuvent entraîner la formation d'ammoniac et/ou de nitrite et contribuer de ce fait à la toxicité de l'échantillon (Servizi et Gordon, 1986). Il se pourrait aussi qu'une forte teneur en solides en suspension inhibe la fécondation ou endommage directement les gamètes. Si on s'inquiète de l'effet de la filtration sur la toxicité, on devrait effectuer un deuxième essai (simultané) avec un échantillon non filtré.

6.3 Eau témoin/de dilution

Pour les essais de *surveillance* et de *vérification de la conformité* réalisés sur des échantillons d'effluent ou de lixiviat, on devrait utiliser, comme eau témoin/de dilution, soit l'eau de mer du laboratoire s'il a été démontré qu'elle donnait invariablement des résultats valides, soit un échantillon d'eau réceptrice. Étant donné que les résultats pourraient différer selon la source, on doit fixer les objectifs de l'essai avant d'effectuer ce choix. On devrait également tenir compte des difficultés et des coûts du transport, car l'utilisation d'eau réceptrice comme eau témoin/de dilution augmente le volume de liquide à expédier au laboratoire. Cependant, les difficultés et les coûts du transport ne seront peut-être pas un facteur important dans ce genre d'analyse à petite échelle.

L'utilisation d'eau réceptrice non contaminée comme eau témoin/de dilution peut être souhaitable s'il faut obtenir de l'information propre au site quant à l'incidence toxique potentielle d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un éluviat sur cette eau (v. 4.3.2). Un exemple important d'une telle situation consisterait à mesurer l'effet subléthal d'une substance à la limite d'une zone de mélange, en vertu des

exigences réglementaires propres à un lieu donné. Les conditions de prélèvement, de transport et d'entreposage des échantillons d'eau réceptrice devraient être conformes aux directives énoncées en 6.1. Tout échantillon d'eau réceptrice utilisée comme eau témoin/de dilution pour l'essai sur un effluent ou un lixiviat devrait être filtré conformément aux recommandations établies pour l'eau témoin/de dilution naturelle, au moyen d'un tamis à mailles de 60 µm (USEPA, 1994; v. aussi 3.4). Si on utilise un échantillon d'eau réceptrice comme eau témoin/de dilution, il faut préparer une solution témoin distincte avec l'eau de mer du laboratoire normalement utilisée pour les essais sur la fécondation (p. ex., l'eau servant au maintien des organismes; v. 4.1.1).

Pour les essais nécessitant un degré élevé de normalisation, on devrait utiliser de l'eau de mer reconstituée (artificielle) comme eau témoin/de dilution (v. 3.4). Il pourrait s'agir, par exemple, d'essais visant à comparer la toxicité d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un éluviat à la toxicité d'échantillons prélevés ou mis à l'essai ailleurs.

Si une SHS artificielle ou naturelle (v. 2.3.4) est ajoutée à l'échantillon ou aux solutions d'essai (v. 6.2), l'essai toxicologique doit inclure une série de témoins (c.-à-d. des *témoins de la SHS*) dont la salinité est ajustée à la salinité requise pour l'essai (soit 30 ± 2 g/kg) en utilisant uniquement cette SHS et de l'eau désionisée. De même, si on ajoute des sels de mer secs du commerce ou des sels de qualité réactif à l'échantillon ou aux solutions d'essai, il faut prévoir une série de témoins (c.-à-d. des *témoins des sels*), préparés avec des sels secs dont la source, le lot et la concentration sont identiques à ceux des sels secs ajoutés à l'échantillon d'essai. Une deuxième série de témoins (c.-à-d. des *témoins de l'eau de dilution*) composés à 100 % d'eau de dilution est requise si l'eau utilisée pour diluer l'échantillon diffère d'une façon quelconque des *témoins de la SHS* ou des *témoins des sels* (v. 4.1.1). La salinité de toutes les concentrations d'essai ne devrait pas s'écarter de plus de 1 g/kg de celle des témoins.

Si on souhaite évaluer l'effet total d'eaux usées, y compris leur salinité (faible ou élevée) à des fins de surveillance réglementaire ou autres (dont la recherche), l'essai pourrait être réalisé sans ajustement de la salinité (à 30 ± 2 g/kg) de l'eau témoin/de dilution ou de l'échantillon/des solutions d'essai. Par exemple, on pourrait ajuster la salinité de l'eau témoin/de dilution à celle de l'eau réceptrice ou à 30 ± 2 g/kg, mais sans ajuster la salinité de l'échantillon ou des solutions d'essai. Ce genre d'évaluation devrait inclure un deuxième essai à salinité ajustée et/ou une série de témoins de salinité (v. 4.1.4).

6.4 Observations et mesures au cours de l'essai

Il convient de mesurer le succès de la fécondation conformément aux instructions énoncées en 4.4.

On devrait observer la couleur, la *turbidité*, l'odeur et l'homogénéité (présence de matières flottantes ou de décantats) de l'échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'éluviat, pendant la préparation des solutions d'essai. On devrait consigner toute réaction ou tout changement évident qui survient au cours de la dilution ou pendant l'essai (p. ex., *précipitation*, *floculation*, formation de mousse, odeur, changement de couleur, accroissement ou diminution de la turbidité).

Dans le cas des échantillons d'effluent renfermant une quantité appréciable de solides, il est souhaitable de mesurer dès leur réception leur teneur en solides en suspension et en matières décantables (APHA et coll., 1989, 2005), qui font partie de la description globale de l'effluent et qui sont des caractéristiques susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai toxicologique.

6.5 Paramètres de l'essai et calculs

Les essais de *surveillance* et de vérification de la *conformité* aux exigences réglementaires devraient normalement comprendre ≥ 3 répétitions par concentration (y compris le

témoin) si un essai à concentrations multiples est exécuté et qu'une CI_p est calculée. Un essai comparant des solutions à concentration maximale à une solution témoin (concentration unique) au moyen du test d'hypothèse devrait normalement inclure, à tout le moins ≥ 4 répétitions. Les modes opératoires pour les essais de vérification de la conformité pourraient préciser qu'une seule concentration (100 % de l'échantillon, à moins d'indication contraire) doit être utilisée ou pourraient exiger la détermination de la CI_p .

Les essais toxicologiques peuvent viser d'autres fins, comme l'identification des sources de toxicité dans une usine ou l'évolution de la toxicité résultant des changements apportés aux procédés ou au traitement des déchets. Ces essais pourraient porter sur des concentrations

multiples ou sur une seule concentration (100 % de la concentration d'origine ou une dilution convenable, plus un témoin).

Les essais à concentration unique sont souvent d'un bon rapport coût-efficacité lorsqu'il s'agit de déterminer si on est en présence ou non d'une toxicité mesurable ou d'évaluer préalablement la toxicité relative d'un nombre élevé d'échantillons. Les paramètres à mesurer dépendraient des objectifs, mais ils pourraient englober les cotes arbitraires « satisfaisant » ou « non satisfaisant » ou le taux de réduction de la fécondation à une concentration donnée. On trouvera en 4.5.3 des indications pertinentes sur l'analyse statistique et les comptes rendus consécutifs aux séries d'essais sur différents échantillons évalués chacun à une concentration seulement.

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons d'eau réceptrice

La présente section renferme des instructions applicables aux essais sur des échantillons d'eau réceptrice. Ces instructions s'ajoutent aux procédures exposées à la section 4.

7.1 Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons

Les méthodes de prélèvement, d'étiquetage, de transport et d'entreposage des échantillons devraient être conformes à celles décrites en 6.1. L'essai devrait être entrepris dans les 24 h suivant le prélèvement, si possible, et pas plus de 3 jours après.

7.2 Préparation des solutions d'essai

On devrait agiter les contenants avant de les vider afin d'assurer leur homogénéité. Pour le mélange des sous-échantillons, la préparation et l'utilisation des témoins et l'ajustement de la salinité de l'échantillon, des solutions d'essai et/ou de l'eau témoin/de dilution, on devrait se reporter aux directives énoncées en 4.1.1, 4.3.2, 6.2 et 6.3.

Chaque échantillon d'eau réceptrice devrait être filtré à travers un tamis à pores de 60 µm avant d'être utilisé afin d'enlever les prédateurs possibles ou les matières en suspension susceptibles de fausser les résultats de l'essai (USEPA, 1994). Lorsqu'on craint une influence des matières en suspension sur la toxicité de l'échantillon ou une réduction de la toxicité consécutive à la filtration de l'échantillon, on devrait effectuer un deuxième essai (simultané) sur un échantillon non filtré, comme il est indiqué en 6.2.

7.3 Eau témoin/de dilution

Pour les échantillons d'eau réceptrice prélevés près d'un point de rejet d'eaux usées, d'un

déversement de substances chimiques ou d'une autre source ponctuelle de contamination possible, on peut prélever parallèlement de l'eau d'« amont » et l'utiliser comme eau témoin/de dilution pour les échantillons d'eau d'« aval ». L'information fournie en 4.1.1 sur l'incidence et les effets possibles de l'eau d'amont utilisée comme eau témoin/de dilution est pertinente dans un tel cas. Cette eau témoin/de dilution devrait être prélevée le plus près possible de la ou des sources de contamination, mais à l'extérieur de sa zone d'influence. Des études du courant ou de la dispersion à l'aide de traceurs pourraient s'imposer pour déterminer le lieu acceptable de prélèvement. L'eau témoin/de dilution provenant d'une source naturelle devrait toujours être filtrée (v. 3.4).

Si on utilise une eau réceptrice non contaminée comme eau témoin/de dilution, on doit préparer une solution témoin distincte avec de l'eau de mer du laboratoire s'il a été démontré qu'elle donnait invariablement des résultats valides dans les essais sur la fécondation chez les échinides. Les conditions d'essai et les méthodes de préparation et d'évaluation devraient être les mêmes pour chaque solution témoin et conformes aux directives données en 4.1 et 5.3.

Des contraintes d'ordre logistique, l'absence d'information sur le lieu du prélèvement, les effets toxiques prévus ou d'autres caractéristiques du lieu pourraient empêcher ou interdire l'utilisation d'eau d'« amont » comme eau témoin/de dilution. Dans un tel cas, on devrait utiliser l'eau de mer du laboratoire si elle convient (c.-à-d. l'eau de maintien des organismes ou l'eau de mer dont on a démontré qu'elle donnait invariablement des résultats valides en regard de la présente méthode). On peut ajuster sa salinité pour reproduire en partie l'eau d'« amont » (v. 4.1.1), mais les restrictions

applicables à la salinité dans la présente méthode empêchent toute manipulation importante.

7.4 Observations et mesures au cours de l'essai

Les observations et mesures relatives aux échantillons et aux solutions d'essai, c'est-à-dire la couleur, la *turbidité*, la formation de mousse, la *précipitation* et autres caractéristiques, devraient être conformes aux indications données en 6.4, pendant la préparation des solutions et en cours d'essai. Ces données s'ajoutent aux observations toxicologiques décrites en 4.4.

7.5 Paramètres de l'essai et calculs

Les paramètres statistiques des essais sur des échantillons d'eau réceptrice devraient être conformes aux options et aux méthodes prévues en 4.5 et 6.5. Ici encore, ces paramètres seraient fondés sur le succès de la fécondation par rapport aux témoins.

Chaque essai sur un échantillon d'eau réceptrice devrait comprendre ≥ 3 répétitions par

concentration (y compris le témoin) si un essai à concentrations multiples est exécuté et qu'une CI_p est calculée. Les paramètres des essais sur des échantillons d'eau réceptrice peuvent souvent être limités aux données sur la fécondation des gamètes exposés à un échantillon d'eau réceptrice non diluée dans les essais à concentration unique (v. 4.5.3). Dans un tel cas, il faut prévoir ≥ 4 répétitions.

Lorsque les échantillons d'eau réceptrice sont vraisemblablement toxiques et qu'on souhaite recueillir de l'information sur le degré de dilution nécessaire pour permettre la fécondation des œufs d'échinides, on devrait effectuer un essai à concentrations multiples pour établir la CI_p , conformément aux méthodes décrites à la section 4, et y inclure comme concentration supérieure de la série un échantillon non dilué.

Certains essais pourraient porter sur une série d'échantillons non dilués d'eau de mer provenant de différents lieux. On devrait se conformer aux méthodes décrites en 4.5.3 pour les tests statistiques et la consignation des résultats.

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons de liquides extraits de sédiments ou de matières semblables

La présente section renferme des instructions générales applicables aux essais sur des liquides extraits d'échantillons de sédiment ou de solides semblables, comme des boues ou des sols. Ces instructions s'ajoutent aux procédures exposées à la section 4. Il importe de souligner que le terme « sédiment » est employé pour des raisons de commodité et qu'il inclut des matières solides semblables, comme des sols ou encore des boues municipales ou industrielles, qui peuvent contribuer à la pollution des eaux naturelles ou qui doivent être soumises à des essais pour d'autres raisons.

8.1 Généralités

Au moment de la publication de la première édition de la présente méthode, en 1992, on considérait de plus en plus important d'évaluer la toxicité des sédiments pour assurer la protection de l'environnement, notamment dans le contexte de l'immersion de déchets en mer, comme le prévoit la Partie 4 de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*. Depuis ce temps, le présent essai sublégal a été exécuté régulièrement sur des échantillons d'eau de porosité de sédiment aux termes du Programme d'immersion en mer afin de déterminer si des déblais de dragage peuvent être immergés en mer (LCPE, 1999; Gouvernement du Canada, 2001). Toutefois, l'influence possible de facteurs confusionnels (p. ex., la présence d'ammoniac et de sulfures dans l'eau de porosité des sédiments) sur l'interprétation des résultats a fait naître des incertitudes quant à l'application de cet essai du point de vue de la réglementation (Scroggins et coll., 2003). Environnement Canada a donc entrepris des recherches en vue de mettre au point et de perfectionner la méthode, ce qui a donné lieu à d'autres directives qui ont amélioré l'essai décrit ici sur la fécondation chez les échinides exposés à l'eau de porosité d'un

sédiment. De plus, Environnement Canada est en train de mettre au point un nouvel essai comportant un contact sédiment-*embryons*/larves afin de mesurer la toxicité d'échantillons de sédiment en phase solide pendant les premières étapes du cycle biologique d'échinides (Buday, 2006, Jackman et Doe, 2004, 2006; McLeay, 2007).

L'essai décrit ici sur la fécondation des œufs d'échinides convient à l'évaluation de la toxicité de liquides extraits de sédiments. Il permet de comparer rapidement des extraits de sédiments contaminés (Long et coll., 1990). L'analyse comparative de 7 essais sur des liquides extraits de sédiments a montré que l'essai mené avec des *embryons* d'échinodermes et l'essai bactériologique Microtox étaient les plus sensibles (Pastorok et Becker, 1989). Les essais de toxicité sublétales, y compris l'essai sur la fécondation chez l'oursin violet de l'Atlantique dans l'eau de porosité de sédiments, étaient beaucoup plus sensibles qu'un essai classique sur un sédiment entier avec des amphipodes (Carr et Chapman, 1992).

Les directives générales qui suivent s'appliquent aux essais sur la fécondation chez des échinides exposés à des liquides extraits de sédiments. Le présent rapport ne renferme pas d'indications sur l'étude sur le terrain ou l'échantillonnage des sédiments, ni sur l'extraction de substances aqueuses ou d'autres matières qu'ils contiennent. On trouvera dans EC (1994) des directives détaillées sur le prélèvement, la manipulation, le transport et l'entreposage d'échantillons de sédiments (v. 8.1.1), de même que des détails sur les procédures d'extraction de liquides (eau de porosité, éluat ou extraits au solvant; v. 8.2) des sédiments, en vue d'essais toxicologiques et d'analyses chimiques ultérieurs. Les directives contenues dans ce document et celles décrites

ici devraient être consultées et suivies. On peut trouver des renseignements sur le fondement de ces directives dans divers ouvrages (p. ex., Mudroch et Macknight, 1991), dans les articles cités dans EC (1994) et dans des études de synthèse sur ce sujet (p. ex., Geisy et Hoke, 1989; McLeay et Sprague, 1991).

L'essai sur la fécondation des œufs d'échinides ne convient pas à des sédiments entiers (c.-à-d. les solides), mais il est utile pour les liquides qui en sont extraits, qu'il s'agisse de lixiviats, d'élutriats, d'extraits au solvant ou d'eau de porosité.

À partir des résultats de l'étude interlaboratoire effectuée en 2008 afin de relever les améliorations à apporter à la partie de la méthode SPE 1/RM/27 relative aux essais sur l'eau de porosité, on a inclus dans les pages qui suivent des procédures additionnelles pour les essais sur des échantillons d'eau de porosité de sédiments (Miller, 2008). Ces procédures peuvent être appliquées afin de réduire l'influence possible de facteurs confusionnels sur les résultats des essais sur la fécondation chez les échinides exposés à l'eau de porosité. Elles sont fondées sur des méthodes mises au point à la Marine Ecotoxicology Research Station, Columbia Environmental Research Centre (Carr, Nipper et Biedenbach, comm. pers., 2008) et incluent l'utilisation d'eau de porosité témoin dans le prétest en vue d'établir le rapport spermatozoïdes:œufs aux fins de l'essai définitif (v. 4.2.3), de même que le recours à une eau de porosité témoin et à un ou des échantillons d'eau de porosité de référence pour déterminer la toxicité (ou son absence) d'échantillons d'eau de porosité provenant de lieux contaminés ou de sites d'intérêt (v. 8.1.4, 8.2.1, 8.2.2 et 8.2.3).

8.1.1 Étiquetage, transport et entreposage des échantillons

On devrait se conformer aux méthodes générales d'étiquetage, de transport et d'entreposage des échantillons de sédiment décrites en 6.1, de même qu'aux indications concernant la plage de températures. Les

échantillons ne doivent pas geler (ni complètement, ni partiellement) et ne doivent pas s'assécher (ASTM, 1991b; EC, 1994).

Dans le cas des liquides provenant d'un sédiment, les contenants et les méthodes de manipulation devraient être conformes aux indications fournies en 6.1 pour les élutriats. Si on utilise un solvant non aqueux pour extraire des substances ou des matières, on devrait conserver ces dernières dans un contenant en verre pour s'assurer qu'elles ne subiront pas l'influence du solvant ou du lixiviat présent dans l'échantillon.

Les essais devraient commencer aussitôt que possible après le prélèvement des échantillons. L'extraction du liquide devrait avoir lieu dans les 2 semaines qui suivent le prélèvement, idéalement dans la première semaine. L'essai doit commencer au plus tard 6 semaines après le prélèvement des échantillons (EC, 1994)⁷⁶. L'essai sur le liquide extrait d'un sédiment devrait commencer dans les 24 h suivant l'extraction des solutions (EC, 1994) et obligatoirement dans les 3 jours, à moins d'indication contraire dans un règlement ou dans une autre méthode désignée.

8.1.2 Préparation des échantillons

La nécessité d'homogénéiser ou non l'échantillon avant l'essai est fonction de la nature de celui-ci et des objectifs de l'essai. Le cas échéant, on doit procéder à un mélange soigneux. Les sous-échantillons (c.-à-d. l'échantillon divisé dans deux ou plusieurs

⁷⁶ Il a été signalé que la toxicité et la géochimie des sédiments contaminés provenant du port de Hamilton avaient changé après un entreposage de ≥ 1 semaine, mais les données étayant cette affirmation n'ont pas été fournies (Brouwer et coll., 1990). L'exécution des essais dans les 2 semaines suivant le prélèvement est conforme aux actuels modes opératoires normalisés des États-Unis (ASTM, 1991b). On a établi qu'une période d'entreposage maximale de 6 semaines était acceptable dans des rapports préliminaires d'Environnement Canada (EC, 1990e, 1990f), et ce, en raison des difficultés d'ordre pratique que soulèvent des périodes plus courtes, dont le délai nécessaire aux analyses chimiques préliminaires à effectuer.

contenants) doivent être mélangés (c.-à-d. regroupés en un échantillon composite). S'il faut entreposer de nouveau l'échantillon, on devrait remettre l'échantillon composite ou une fraction de celui-ci dans les contenants des sous-échantillons.

8.1.3 Observations et mesures

Pendant la préparation des solutions d'essai, on devrait observer la couleur, la *turbidité*, la formation de mousse, la *précipitation* et d'autres caractéristiques du sédiment et de tout liquide qui en provient, conformément aux indications données en 6.4.

8.1.4 Liquide provenant du sédiment témoin et du sédiment de référence

Le liquide (eau de porosité) extrait d'un ou de plusieurs échantillons du sédiment témoin et/ou du *sédiment de référence* (non contaminé)⁷⁷ doit être analysé de la même façon que celui extrait du sédiment d'essai. Les liquides provenant du sédiment de référence et du *sédiment témoin* servent à des fins différentes. L'eau de porosité du sédiment de référence, qui est utilisée comme eau de référence du site, permet de comparer les effets biologiques observés pendant l'essai sur l'eau de porosité du sédiment d'essai. Dans la mesure du possible, on devrait

⁷⁷ Un *sédiment de référence* est un échantillon d'un sédiment présumé non contaminé, prélevé sur le terrain et choisi pour ses propriétés (p. ex., taille du grain) représentatives des conditions sédimentaires étroitement appariées à celles du sédiment d'essai, sauf pour ce qui est de la teneur en contaminants chimiques. Il provient souvent d'un endroit situé dans les environs du ou des sites de prélèvement des échantillons du sédiment d'essai. Dans certains cas, il peut s'avérer toxique à cause de substances chimiques qu'on trouve naturellement dans l'environnement ou de la présence inattendue de contaminants d'origine anthropique. Un *sédiment témoin*, par contre, est un sédiment non contaminé, c'est-à-dire ne renfermant aucun contaminant susceptible d'influer sur la fécondation des œufs d'échinides. Il peut avoir des propriétés physicochimiques qui ne correspondent pas à celles du sédiment d'essai et il n'est pas nécessairement prélevé dans les environs du sédiment d'essai. Il sert tout simplement de base pour l'interprétation des données des essais toxicologiques sur un ou des sédiments. Un sédiment de référence non contaminé peut servir de sédiment témoin.

toujours se servir de l'eau de porosité de référence à des fins de comparaison, car cela permet d'évaluer la toxicité d'un lieu donné. Cependant, Environnement Canada et d'autres laboratoires ont souvent relevé des effets toxiques évidents de l'eau de porosité provenant de sédiments de référence non contaminés ou ont noté que l'eau de porosité de référence non identifiée dans le cas d'échantillons codés ou à blanc ne se prêtait pas à des comparaisons. Dans de tels cas, il faudrait comparer les effets biologiques de l'eau de porosité d'essai à ceux de l'eau de porosité du sédiment témoin. Par conséquent, de l'eau de porosité provenant d'un ou de plusieurs sédiments témoins (« non contaminés ») devrait être incluse en tant qu'échantillon dans chaque essai sur l'eau de porosité d'un sédiment (ou d'une série de sédiments), pour faciliter l'établissement d'un niveau de base (« normal »). À cette fin, il serait souhaitable d'adopter un « *sédiment témoin* » non contaminé et normalisé ou, idéalement, une série de sédiments de référence aux caractéristiques différentes qu'on pourrait appairer aux caractéristiques des sédiments à l'étude.

Idéalement, le ou les sédiments de référence devraient avoir les mêmes propriétés physicochimiques que le ou les sédiments à l'étude et être représentatifs des facteurs confusionnels (c.-à-d. les facteurs autres que les contaminants préoccupants) susceptibles d'être présents dans l'échantillon d'eau de porosité (Scroggins et coll., 2003)⁷⁸. Toutefois, il est également important d'utiliser de façon courante une eau de porosité non contaminée (ou eau de porosité témoin) dans les essais sur l'eau de porosité afin de disposer d'une base d'interprétation des données de l'essai. On peut prélever l'eau de porosité témoin d'un sédiment peu contaminé et à faible teneur en ammoniac et en sulfures. Une fois qu'on a repéré un sédiment témoin convenable (non contaminé, stable,

⁷⁸ On devrait tenter le plus possible d'appairer le spectre granulométrique et l'équilibre des matières organiques et inorganiques (ASTM, 1991a, 1991b; McLeay et Sprague, 1991).

connu pour donner un bon taux de fécondation, etc.), on peut en extraire de grands volumes d'eau de porosité et entreposer celle-ci (c.-à-d. la congeler) aux fins d'essais ultérieurs. L'eau de porosité du sédiment témoin sert à d'autres fins que l'eau de mer témoin du laboratoire (à savoir l'eau témoin/de dilution), qui donne une mesure directe de la validité de l'essai. On devrait généralement utiliser les deux types d'eau témoin (eau de mer du laboratoire et eau de porosité provenant d'un sédiment témoin convenable) dans les essais toxicologiques sur l'eau de porosité d'un sédiment contaminé (Scroggins et coll, 2003), de même qu'un échantillon approprié d'eau de porosité provenant d'un ou de plusieurs sites de référence, car l'expérience montre que l'eau de mer témoin du laboratoire, employée seule, ne permettrait peut-être pas d'obtenir une évaluation acceptable de la toxicité de l'eau de porosité.

Il n'existe pas de méthode exclusive pour traiter les résultats obtenus pour le sédiment témoin et le sédiment de référence (c.-à-d. l'eau de porosité). Toutefois, si on inclut dans l'essai l'eau de porosité témoin et l'eau de porosité de référence, qu'on les traite de la même façon que l'eau de porosité d'essai (v. 8.2.1 et 8.2.2) et qu'on les soumet simultanément à un essai, on peut procéder à des tests pour vérifier s'il existe des écarts significatifs entre les résultats obtenus pour le sédiment de référence/témoin et le sédiment d'essai [en d'autres termes, on peut utiliser l'eau de porosité témoin comme base pour établir la présence ou l'absence de toxicité à chaque niveau de traitement (v. 8.2.3); en outre, l'eau de porosité de référence, s'il ne s'agit pas d'un échantillon à blanc ou codé, peut permettre d'évaluer la toxicité propre à un site]. On devrait faire preuve de prudence dans l'interprétation des résultats obtenus pour la substance ou matière d'essai et on devrait s'assurer du concours d'un statisticien. Lorsqu'on ne dispose d'aucun échantillon d'eau de porosité de référence ou d'eau de porosité témoin, il pourrait être nécessaire d'utiliser l'eau témoin du laboratoire (eau témoin/de dilution) à des fins de comparaison avec les

résultats des essais sur l'eau de porosité d'échantillons prélevés dans le milieu naturel, mais cette façon de procéder est moins souhaitable⁷⁹. Si on n'utilise que l'eau témoin/de dilution aux fins des comparaisons, on ne dispose alors d'aucun témoin des facteurs confusionnels, et l'interprétation des résultats de l'essai pourrait exiger la connaissance des limites de tolérance des espèces d'essai pour pouvoir déterminer si les échantillons d'essai présentent de tels facteurs. En outre, toute évaluation de la toxicité propre à un site s'en trouverait limitée.

8.2 Essais sur des liquides provenant de sédiments et de solides semblables

Les toxiques que contiennent les sédiments ou les sols peuvent évoluer en phase aqueuse et avoir une incidence sur les organismes présents dans les eaux naturelles. La phase aqueuse peut être un liquide provenant du sol ou du sédiment (p. ex., eau interstitielle ou eau de porosité) ou un liquide utilisé pour traiter un échantillon et en extraire les toxiques potentiels (p. ex., un éluat).

Un liquide provenant d'un sédiment soumis à un essai toxicologique devrait vraisemblablement appartenir à l'une ou l'autre des quatre grandes catégories suivantes :

- 1) de l'eau interstitielle, qui remplit l'espace entre les particules (c.-à-d. l'eau de porosité) et qui pourrait procéder d'un

⁷⁹ Les matrices de l'eau de porosité non contaminée et de l'eau de mer filtrée sont très différentes et ne se comportent pas de la même façon dans les essais sur la fécondation [p. ex., les échantillons d'eau de porosité non contaminée donnent souvent un taux de fécondation moins élevé (mais tout de même acceptable) que les échantillons d'eau de mer filtrée]. En conséquence, pour les essais sur l'eau de porosité, l'eau de porosité non contaminée (ou eau de porosité témoin) possède une matrice qui convient mieux à la détermination du rapport spermatozoïdes:œufs aux fins de l'essai (v.4.2.3) et aux comparaisons (avec le témoin négatif) permettant de déterminer si l'eau de porosité d'essai est toxique ou non.

échange avec l'eau sus-jacente d'un estuaire, d'une baie, etc., qu'on extrait généralement du sédiment par centrifugation ou par compression (ASTM, 1991b);

- 2) de l'eau, essentiellement de l'eau douce, utilisée pour obtenir un extrait aqueux des matières que contient un sédiment (c.-à-d. un éluviat), par exemple, en agitant un échantillon dans une solution d'eau non contaminée. Cette catégorie n'est pas très appropriée pour les essais sur la fécondation des œufs d'échinides;
- 3) de l'eau témoin/de dilution ou toute autre eau non contaminée dont la salinité équivaut à celle de l'eau de mer et qui sert à obtenir un extrait aqueux, comme en 2 ci-dessus;
- 4) des solvants autres que l'eau (p. ex., solvants organiques), utilisés pour piéger des substances ou matières de l'échantillon de sédiment (Schiewe et coll., 1985; True et Heyward, 1990).

L'eau des trois premières catégories pourrait être analysée comme un échantillon liquide normal, conformément aux méthodes universelles décrites à la section 4 et aux modes opératoires décrits à la section 6 pour les effluents, les lixiviats et les éluviats. Pour ce qui est de la quatrième catégorie (les solvants), l'option privilégiée consiste à utiliser la même concentration de solvant dans chaque récipient d'essai. On porte l'eau témoin/de dilution à utiliser dans l'essai à la même teneur en solvant que la concentration la plus élevée de l'échantillon d'essai. Des concentrations moins élevées sont préparées avec de l'eau témoin/de dilution modifiée pour que l'effet du solvant, le cas échéant, soit le même dans tous les récipients. On devrait disposer d'un témoin sans solvant en plus du témoin avec solvant. De plus, il serait souhaitable de réaliser un essai distinct pour déterminer la CI_p du solvant.

8.2.1 Préparation des échantillons d'essai

Un document d'Environnement Canada (EC, 1994) contient des directives précises sur l'extraction des liquides (p. ex., eau de porosité, éluviat ou extrait au solvant) d'un sédiment. Ces directives devraient être consultées et suivies lors de la préparation des extraits pour les essais sur la fécondation chez les échinides, de même que de l'eau de porosité témoin et de référence⁸⁰.

Le mélange des « sous-échantillons » du liquide extrait des sédiments (p. ex., des extraits successifs) devrait être conforme aux instructions énoncées en 6.2. Les sous-échantillons ne devraient pas être mélangés si on cherche à déterminer la toxicité relative de chacun des extraits successifs. Les échantillons ou sous-échantillons d'éluviat ou d'eau de porosité devraient être centrifugés pour éliminer les solides en suspension (EC, 1994). Seuls les échantillons d'eau de porosité témoin peuvent être congelés en vue de leur entreposage à long terme. La congélation peut se faire à -20 °C; l'entreposage à cette même température peut durer jusqu'à 1 an, à la condition que les échantillons soient exempts de particules avant la congélation. Pour obtenir une eau de porosité exempte de particules, on devrait centrifuger 2 fois les échantillons (p. ex., après centrifugation à $\sim 3\,000 \times g$ pendant 15 min à 4 °C, on recueille l'eau de porosité en prenant soin de ne pas enlever les particules près de la couche de sédiment, puis on centrifuge de nouveau l'eau de porosité à $\sim 3\,000 \times g$ pendant 15 min à 4 °C). Les échantillons devraient être décongelés la veille de l'essai. Une fois

⁸⁰ Une étude menée par le Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique d'Environnement Canada a confirmé que la collecte d'échantillons d'eau de porosité par centrifugation devait se faire à 4 °C et $10\,000 \times g$, conformément à la recommandation formulée dans EC (1994). Cette étude a montré que les échantillons présentaient une toxicité plus élevée lorsque la centrifugation se faisait à 4 °C plutôt qu'à la température ambiante. La vitesse de la centrifugation ($2\,700 \times g$ plutôt que $10\,000 \times g$) n'avait aucun effet sur la toxicité de l'eau de porosité, mais le volume recueilli doublait presque à la vitesse plus élevée ($10\,000 \times g$) (Jackman et Doe, 2004).

décongelés, il faudrait les centrifuger afin d'en retirer les particules en suspension qui ont précipité, car celles-ci pourraient empêcher les spermatozoïdes de repérer et de féconder les œufs (Carr et Chapman, 1995). On devrait déterminer le pH et la teneur en OD de l'échantillon en tenant compte des limites précisées en 4.1.2 et 4.1.3.

Une fois le liquide obtenu, on prépare les concentrations d'essai de la manière habituelle (v. 4.1.2). Comme pour les essais sur un effluent, un lixiviat et un éluviat, l'essai pourrait être à concentration unique (plus un témoin) s'il s'agit de vérifier la conformité aux règlements, ou à concentrations multiples si on souhaite déterminer la CI_p (v. 6.5). Les méthodes de prélèvement et d'analyse du liquide provenant des échantillons de sédiment témoin ou de référence devraient être les mêmes que pour le sédiment d'essai.

8.2.2 Eau témoin/de dilution

Si l'échantillon de sédiment provient d'un milieu marin ou estuarien et que l'eau qui en est extraite est essentiellement de l'eau de mer dont la salinité se situe dans la plage prévue pour l'essai (28-32 g/kg), il est recommandé de se conformer aux méthodes universelles décrites à la section 4.

Lorsque le liquide provenant d'un sédiment se compose surtout d'eau douce ou que sa salinité est inférieure à celle de l'eau de mer normale (c.-à-d. une eau comparable à celle d'un estuaire), on devrait normalement ajuster la salinité de toutes les solutions d'essai et solutions témoins en fonction d'une même valeur (≤ 1 g/kg de la plage de 28-32 g/kg). Pour ce faire, on ajuste habituellement une aliquote de l'échantillon conformément aux méthodes décrites en 4.3.2. Il est recommandé d'utiliser des sels de mer secs du commerce, des sels de qualité réactif ou de la SHS naturelle ou artificielle, comme il est indiqué en 2.3.4.

Dans les essais à concentrations multiples d'eau de porosité, il faut utiliser la même eau témoin/de dilution (p. ex., l'eau de mer du

laboratoire) pour l'eau de porosité de référence et/ou témoin, de même que pour les dilutions et les témoins de l'eau de porosité d'essai. De plus, l'eau de porosité de référence et/ou témoin et l'eau de porosité d'essai doivent inclure les mêmes traitements (c.-à-d. des dilutions de l'eau de porosité) et devraient comporter le même nombre de répétitions pour chaque traitement (pour faciliter les essais lorsqu'il y a d'importants écarts entre les résultats obtenus pour l'eau de porosité).

Pour le calcul de la CI_p , il faut prévoir ≥ 3 répétitions par traitement (on en recommande 5) et 7 concentrations d'essai (on en recommande un plus grand nombre) (v. 4.1.2, 4.1.3 et 4.5.2).

8.2.3 Paramètres et calculs

Les paramètres des essais sur des liquides provenant de sédiments devraient être conformes aux options et aux démarches énoncées en 4.5 et 6.5.

Pour déterminer statistiquement s'il y a d'importants écarts entre l'eau de porosité de référence et/ou témoin et l'eau de porosité d'essai, on compare le taux de fécondation dans chaque traitement de l'eau de porosité d'essai au traitement équivalent de l'eau de porosité de référence et/ou témoin à l'aide du test-*t* de Dunnett⁸¹.

⁸¹ On compare le taux de fécondation obtenu dans un échantillon d'eau de porosité d'essai à 100 % à celui obtenu dans l'eau de porosité de référence ou témoin à 100 % également. On procède de même pour les dilutions à 50 % de l'eau de porosité d'essai et de l'eau de porosité de référence ou témoin à 50 % également. Le diluant utilisé pour l'échantillon et pour l'eau de porosité de référence ou témoin est le même (à savoir de l'eau de mer filtrée).

Rapports à produire

Le rapport d'essai doit mentionner tout écart relativement aux *exigences absolues* exposées aux sections 2 à 8 de la présente méthode et, le cas échéant, fournir des précisions. Le lecteur doit pouvoir déterminer, à partir de ce document, si les conditions et les modes opératoires préalables et expérimentaux ont rendu les résultats valides et acceptables pour l'usage qu'on entend en faire.

La sous-section 9.1 ci-après énumère les renseignements à inclure dans le rapport relatif à l'essai. Ces renseignements, de même que ceux à fournir séparément dans un rapport général ou à conserver pendant ≥ 5 ans, sont précisés en 9.2. Des programmes particuliers de *surveillance* ou des *protocoles* expérimentaux connexes pourraient exiger d'intégrer dans le rapport d'essai certains des renseignements énumérés en 9.2 et propres à l'essai ou de les « conserver dans les dossiers » (p. ex., des précisions sur la matière d'essai et/ou les modes opératoires et conditions propres au prélèvement, à la manipulation, au transport et à l'entreposage des échantillons).

On peut citer les conditions et modes opératoires communs à une série d'essais en cours (p. ex., essais de toxicité systématiques exécutés à des fins de *surveillance* ou de *vérification de la conformité aux règlements*) et conformes aux exigences de la présente méthode; on peut aussi joindre un rapport général exposant dans ses grandes lignes la pratique ordinairement suivie en laboratoire.

Les détails relatifs à la conduite et aux résultats de l'essai qui ne sont consignés ni dans le rapport d'essai ni dans un rapport général doivent être conservés par le laboratoire pendant ≥ 5 ans, de sorte qu'on puisse fournir l'information pertinente si l'essai doit faire l'objet d'une vérification. L'information à conserver peut comprendre les éléments suivants :

- un enregistrement de la chaîne de possession des échantillons mis à l'essai à des fins de surveillance ou d'application d'un règlement;
- une copie du dossier d'acquisition de l'échantillon ou des échantillons;
- certains résultats des analyses chimiques de l'échantillon ou des échantillons;
- les notes de laboratoire sur les observations et les mesures effectuées au cours de l'essai;
- les notes de laboratoire et la ou les cartes de contrôle pour les essais toxicologiques de référence;
- les dossiers détaillés concernant la provenance et la santé des organismes d'essai;
- des renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des instruments.

Le personnel de laboratoire effectuant les essais doit signer et dater les feuilles de données originelles.

9.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai

Voici la liste des renseignements à inclure dans le rapport relatif à chaque essai.

9.1.1 Substance ou matière d'essai

- une courte description du type d'échantillon (p. ex., produit ou substance chimique, effluent, éluviat, lixiviat, eau réceptrice ou liquide extrait d'un sédiment ou d'un solide semblable) et de son volume ou poids (dans le cas d'un échantillon sec), tel qu'il a été fourni au laboratoire, le cas échéant;
- des renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon;

- la date du prélèvement de l'échantillon; la date et l'heure de sa réception à l'installation d'essai;
- la température de l'échantillon d'effluent ou de lixiviat à l'arrivée au laboratoire;
- le pH et la teneur en OD de l'échantillon d'eaux usées ou d'eau réceptrice, juste avant la préparation et l'utilisation de l'échantillon dans l'essai toxicologique;
- dans le cas d'un essai sur un éluviat ou sur tout autre liquide extrait d'un sédiment ou d'un solide semblable, les dates de préparation et d'utilisation; la description de la méthode de préparation.

9.1.2 Organismes d'essai

- l'espèce et la provenance;
- une courte description du temps et des conditions de maintien des adultes;
- le taux de mortalité des adultes reçus et maintenus pour une brève période (≤ 3 jours) et/ou des adultes acclimatés et maintenus pendant une plus longue période (> 3 jours);
- tout aspect, comportement ou traitement inhabituel des adultes ou des gamètes, avant le début de l'essai.

9.1.3 Installations et appareils

- le nom et l'adresse du laboratoire d'essai;
- le nom de la ou des personnes ayant réalisé l'essai;
- une courte description des récipients d'essais (taille, forme, type de matériau).

9.1.4 Eau témoin/de dilution

- le ou les types et la ou les sources de l'eau utilisée comme eau témoin/de dilution;
- le ou les types, la ou les sources et la méthode de collecte de l'eau de porosité témoin et/ou de référence utilisée, le cas échéant;

- le type et la quantité de toute substance chimique ajoutée à l'eau témoin/de dilution.

9.1.5 Méthode d'essai

- le nom de la méthode d'essai biologique employée (conformément au présent document) et les options choisies;
- le plan d'étude et la description de toute technique spéciale (p. ex., essai réalisé avec ou sans filtration des échantillons, préparation et utilisation d'un éluviat; préparation et utilisation d'un solvant et, dans ce cas, du témoin du solvant);
- une courte description de la méthode de préparation de la SHS et de la durée de son vieillissement;
- une courte description de la ou des méthodes, des produits utilisés et de la durée du vieillissement s'il y a eu ajustement de la salinité de l'eau témoin/de dilution, de l'échantillon ou des solutions d'essai;
- une brève description de la ou des méthodes utilisées s'il y a eu filtration et/ou ajustement du pH de l'échantillon ou des solutions témoins;
- une courte description de la fréquence et du type de toute observation et mesure en cours d'essai;
- le nom des programmes et des méthodes employés pour calculer les paramètres statistiques; des renvois à ces programmes et méthodes.

9.1.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- la raison et la description de tout écart ou de toute omission en regard des conditions et modes opératoires exposés dans le présent document;
- le nombre, la concentration, le volume et la hauteur des solutions dans les récipients d'essai, y compris les témoins;

- le nombre de répétitions par traitement;
- un bref énoncé témoignant de la vérification de la viabilité des gamètes et de la conduite d'un prétest;
- le nombre estimatif de spermatozoïdes par récipient et le rapport spermatozoïdes:œufs;
- le nombre de mâles et de femelles dont on a combiné le sperme et les œufs;
- une brève description de la méthode de préaération (le cas échéant, taux et durée) de l'échantillon ou des solutions d'essai avant la mise en route de l'essai;
- la température, la salinité, le pH et la teneur en OD (mg/L et pourcentage de saturation) dans les aliquotes des solutions d'essai (y compris les témoins) au début de l'essai;
- la durée de l'entreposage (temps de conservation des œufs) des récipients d'essai précédant la numération;
- la date de mise en route de l'essai; la durée de l'essai;
- la date de l'essai toxicologique de référence et une brève indication selon laquelle il a été réalisé (ou non) dans les mêmes conditions expérimentales que celles employées pour l'échantillon ou les échantillons d'essai; une description de tout écart ou de toute omission en regard des modes opératoires et conditions exigés pour l'essai toxicologique de référence.

9.1.7 Résultats de l'essai

- pour chaque solution d'essai de répétition (y compris chaque répétition témoin), le nombre d'œufs fécondés et non fécondés dans chaque récipient à la fin de l'essai;
- le pourcentage moyen (\pm ET) ou la proportion d'œufs fécondés dans chaque récipient d'essai et chaque traitement (p. ex., chaque concentration), y compris les témoins;

- la CI_p (et ses limites de confiance de 95 %) pour les données sur le pourcentage de fécondation ou la proportion d'œufs fécondés; des détails relatifs aux techniques de pondération utilisées et une indication des statistiques quantitatives employées;
- l'existence de valeurs aberrantes et la justification de leur suppression;
- la durée et les résultats de tout essai toxicologique avec le ou les toxiques de référence, réalisé parallèlement à l'essai ou dans les 14 jours précédant l'essai, avec la moyenne géométrique (\pm 2 ET) pour le ou les mêmes toxiques de référence établie par le laboratoire lors d'essais antérieurs avec les mêmes espèces;
- toute anomalie dans le déroulement de l'essai, tout problème observé et toute mesure corrective qui a été prise.

9.2 Exigences supplémentaires

Voici la liste des éléments qui doivent soit être inclus dans le rapport d'essai ou dans le rapport général, soit être conservés dans les dossiers pendant ≥ 5 ans.

9.2.1 Substance ou matière d'essai

- le nom de la ou des personnes qui ont prélevé et/ou fourni l'échantillon;
- la chaîne de possession de l'échantillon et des feuilles d'entrées logarithmiques;
- les conditions de conservation de l'échantillon à l'arrivée et pendant l'entreposage (p. ex., température, clarté/obscurité, contenants scellés).

9.2.2 Organismes d'essai

- les certificats de confirmation taxinomique des espèces; tous les dossiers du fournisseur accompagnant chaque envoi, y compris le nombre d'organismes expédiés, la date et l'heure de l'envoi; la température et la teneur en OD de l'eau présente dans le ou les contenants d'expédition (ou du ou des

contenants eux-mêmes si les adultes sont expédiés à sec) au moment de l'envoi et de la réception;

- une description des conditions et méthodes de maintien des adultes, y compris les éléments suivants : installations et appareillage; éclairage; source et qualité de l'eau; *prétraitement* de l'eau; taux et type de renouvellement de l'eau; densité des adultes dans les réservoirs; température dans les réservoirs;
- le type et l'origine des aliments donnés aux adultes maintenus dans les réservoirs; la méthode de préparation et de conservation des aliments; les méthodes d'alimentation, la fréquence et les rations;
- l'incidence de maladies chez les adultes; des détails concernant tout traitement administré aux adultes malades;
- les dossiers et les résultats de l'évaluation de la maturation des gonades, du succès et de la période du frai, de la fécondité et des taux de fécondation avant l'essai;
- les modes opératoires et conditions pour provoquer le frai et recueillir les gamètes et déposer ceux-ci dans les récipients d'essai.

9.2.3 *Installations et appareillage*

- la description des systèmes de réglage de l'éclairage et de la température dans les installations d'essai;
- la description des méthodes de nettoyage ou de rinçage de l'appareillage.

9.2.4 *Eau témoin/de dilution*

- des détails sur l'échantillonnage et l'entreposage si l'eau témoin/de dilution provient d'une eau réceptrice d'« amont »;
- des détails relatifs à tout *prétraitement* de l'eau (p. ex., modes opératoires et conditions pour l'ajustement de la salinité, la filtration, la stérilisation, l'ajustement de la température, le dégazage, l'aération);

- toute variable de la qualité de l'eau (v. 2.3.4) mesurée avant et/ou lors de la mise en route de l'essai.

9.2.5 *Méthode d'essai*

- une description des essais menés antérieurement par le laboratoire conformément à la présente méthode d'essai biologique et réalisés selon les mêmes modes opératoires, dans les mêmes conditions et avec les mêmes espèces;
- les modes opératoires employés pour préparer et entreposer les solutions mères et/ou les solutions d'essai de substances chimiques; la description et la ou les concentrations de tout solvant utilisé;
- les modes opératoires (avec références) utilisés pour les analyses chimiques de l'échantillon ou des solutions d'essai; des détails relatifs à l'échantillonnage, à la préparation et à l'entreposage de l'échantillon/de la solution, préalablement aux analyses chimiques;
- l'utilisation et la description d'un prétest (délimitation d'une plage de valeurs).

9.2.6 *Conditions et méthodes d'essai*

- la photopériode, la source d'éclairage et l'intensité lumineuse à proximité de la surface des solutions d'essai;
- les conditions, les modes opératoires et la fréquence des essais sur des toxiques de référence;
- les mesures de la qualité de l'approvisionnement en eau utilisée dans les réservoirs de maintien et comme eau témoin/de dilution (v. 2.3.4);
- toute autre analyse chimique de l'échantillon et des solutions mères ou des solutions d'essai (p. ex., concentrations de la ou des substances chimiques spécifiques, teneur en solides en suspension) effectuée avant l'essai et/ou au début de l'essai;

- l'aspect de l'échantillon ou des solutions d'essai; les changements observés en cours d'essai.

9.2.7 *Résultats de l'essai*

- les résultats de l'essai ou des essais de délimitation d'une plage de valeurs menés parallèlement à l'essai définitif, le cas échéant;
- les résultats du prétest et de la vérification de la viabilité des gamètes;
- la représentation graphique des données dose-réponse;
- les résultats de toute analyse statistique avec et sans les valeurs aberrantes; pour les analyses de régression, les données relatives à la taille de l'échantillon (p. ex., nombre de répétitions par traitement), les valeurs estimatives des paramètres avec la variance ou l'erreur type, tout tableau ANOVA produit, les graphiques des valeurs ajustées et observées de tout modèle utilisé, les résultats des tests sur les valeurs aberrantes, les résultats des tests sur la normalité et l'homoscédasticité et la façon dont le modèle présentant le meilleur ajustement a été choisi;
- la carte de contrôle montrant les résultats les plus récents et les résultats historiques des essais toxicologiques sur un ou des toxiques de référence;
- tout autre effet observé;
- les originaux des notes de laboratoire et d'autres feuilles de données, signés et datés par les membres du personnel du laboratoire qui ont effectué les essais et les analyses connexes.

Références

- Abernethy, S.G., et G.F. Westlake, *Guidelines for pH Adjustment of Effluent Samples of Toxicity Testing*, ISBN 0-7729-5947-1, Direction des ressources en eau, Ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale (Ont.) (1989).
- Agius, S., communication personnelle, Programme d'immersion en mer, Environnement Canada, Hull (Qué.) (2008).
- Anderson, S.L., M.P. Carlin et A.L. Suer, « Effluent and Ambient Toxicity Programs in the San Francisco Bay Region », p. 153-164, dans *Proc. Seventeenth Annual Aquatic Toxicity Workshop: Nov. 5-7, 1990*, P. Chapman, F. Bishay, E. Power, K. Hall, L. Harding, D. McLeay, M. Nassichuk et W. Knapp (dir.), *Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, n° 1774, Pêches et Océans Canada, Vancouver (C.-B.) (1991).
- Anderson, S.L., et T.J. Norberg-King, « Precision of Short-term Chronic Toxicity Tests in the Real World », *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:143-145 (1991).
- APHA, AWWA et WEF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation, « Toxicity », partie 8000, p.8-1 à 8-173, dans *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21^e éd., Washington (DC) (2005).
- APHA, AWWA et WPCF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Pollution Control Federation), « Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms », partie 8000, p. 8-1 à 8-143, dans *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17^e éd., Washington (DC) (1989).
- AquaTox Testing and Consulting Inc, *Implementation of statistical guidance for ecotoxicological data derived using the echinoid fertilization test*, préparé pour l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, projet n° 162704764 (2009).
- Armstrong, F.A.J., et D.P. Scott, « Photochemical Dechlorination of Water Supply for Fish Tanks with Commercial Water Sterilizers », *Journal de l'Office des recherches sur les pêcheries du Canada*, 31:1881-1885 (1974).
- ASTM (American Society for Testing and Materials), *Proposed Standard Guide for Conducting Toxicity Tests with Sperm and Eggs of Sea Urchins and Other Echinoids*, ASTM Subcommittee E-47.01 on Aquatic Toxicology (G.A. Chapman, prés.), ébauche n° 4 (5 fév. 1990), Philadelphie (PA) (1990).
- _____, « Standard Guide for Conducting 10-day Static Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Amphipods », p. 1052-1075, dans *1991 Annual Book of ASTM Standards*, E1367-90, Philadelphie (PA) (1991a).
- _____, « Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicity Testing », p. 1105-1119, dans *1991 Annual Book of ASTM Standards*, E1391-90, Philadelphie (PA) (1991b).
- _____, « Standard Guide for Use of Lighting in Laboratory Testing », p. 1249-1259, dans *1999 Annual Book of ASTM Standards*, Vol. 11.05, E-1733-95, Philadelphie (PA) (1999).
- _____, « Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests with Echinoid Embryos », p. 936-956, dans *2002 Annual Book of ASTM Standards*, Vol. 11.05, E1563-98, West Conshohocken (PA) (2002).
- Barnes, R.D. *Invertebrate Zoology*, 3^e éd., W.B. Saunders Co., Philadelphie (PA) (1974).
- Bay, S., communication personnelle, Southern California Coastal Water Research Project, Costa Mesa (CA) (2008).
- Bay, S., et D. Greenstein, communication personnelle, Southern California Coastal Water Research Project, Costa Mesa (CA) (2008).

- Beak (Beak Consultants Ltd.), *Toxicity Testing Quality Assurance Test Round Results*, préparé pour le California Regional Quarter Quality Control Board, rapport n° 880903, Brampton (Ont.) (1988).
- Bidwell, J.P., et S. Spotte, *Artificial Seawaters, Formulas and Methods*, Jones and Bartlett Pub. Inc., Boston (MA) (1985).
- Biedenbach, J., et S. Carr, communication personnelle, Columbia Environmental Research Centre, TAMU-CC, Centre for Coastal Studies, Corpus Christi (TX) (2008).
- Billington, J.W., G.-L. Huang, F. Szeto, W.Y. Shiu et D. MacKay, « Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: I. Single Component Systems », *Environ. Toxicol. Chem.*, 7:117-124 (1988).
- BML (Bodega Marine Laboratory), *BML Sea Urchin Fertilization Assay Protocol Procedure*, manuscrit, University of California (1991).
- Bouck, G.R., « Gasometer: An Inexpensive Device for Continuous Monitoring of Dissolved Gases and Supersaturation », *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 111:505-516 (1982).
- Bougis, P., « Sur l'effet biologique du cuivre en eau de mer », *C.R. Acad. Sci. Paris*, 249:326-328 (1959).
- Brouwer, H., T. Murphy et L. McArdle, « A Sediment-contact Bioassay with *Photobacterium phosphoreum* », *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:1353-1358 (1990).
- Buday, C., *Sydney Harbour Echinoid Embryo Development Test on Sediment/Water Contact - Toxicity Test Results*, rapport sommaire (inédit) préparé par le Centre des sciences environnementales du Pacifique, North Vancouver (C.-B.) (2006).
- Buday, C., communication personnelle, Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon, North Vancouver (C.-B.) (2008).
- Carr, R.S., et D.C. Chapman, « Comparison of Solid-phase and Pore-water Approaches for Assessing the Quality of Marine and Estuarine Sediments », *Chem. Ecol.*, 7:19-30 (1992).
- _____, « Comparison of Methods for Conducting Marine and Estuarine Sediment Porewater Toxicity Tests - Extraction, Storage, and Handling Techniques », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28:69-77 (1995).
- Carr, R.S., J.M. Biedenbach et M. Nipper, « Influence of Potentially Confounding Factors on Sea Urchin Porewater Toxicity Tests », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51:573-579 (2006).
- Carr, S., M. Nipper et J. Biedenbach, communication personnelle, Columbia Environmental Research Centre, TAMU-CC, Centre for Coastal Studies, Corpus Christi (TX) (2008).
- Carroll, R.J., et D. Ruppert, *Transformation and Weighting in Regression*, Chapman and Hall, New York (1988).
- CCMRE (Conseil canadien des ministres des Ressources et de l'Environnement), *Recommandations pour la qualité des eaux au Canada*, Groupe de travail sur les lignes directrices relatives à la qualité de l'eau, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) (1987).
- Chapman, G.A., *Sea Urchin Sperm Test Protocol for Interlaboratory Comparison*, manuscrit, Pacific Ecosystems Branch, U.S. Environmental Protection Agency, Newport (OR) (1991).
- _____, *Sea Urchin (Strongylocentrotus purpuratus) Fertilization Test Method*, manuscrit définitif, Pacific Ecosystems Branch, U.S. Environmental Protection Agency, Newport (OR) (1992a).
- _____, communication personnelle, USEPA, Newport (OR) (1992b).
- Cherr, G.N., J.M. Shenker, C. Lunkmark et K.O. Turner, « Toxic Effects of Selected Bleached Kraft Mill Effluent Constituents on the Sea Urchin Sperm Cell », *Environ. Toxicol. Chem.*, 6:561-569 (1987).
- Deitzer, G. « Spectral Comparisons of Sunlight and Different Lamps », p. 197-199, dans *Proceedings of International Lighting in Controlled Environments Workshop* (T.W. Tibbits, réd.), 1^{er} mars 1994, Madison (WI) (1994).

- Dinnel, P.A., et Q.J. Stober, *Methodology and Analysis of Sea Urchin Embryo Bioassays*, circ. n° 85-3, School of Fisheries, University of Washington, (1985).
- _____, « Application of the Sea Urchin Sperm Bioassay to Sewage Treatment Efficiency and Toxicity in Marine Waters », *Mar. Environ. Res.*, 21:121-133 (1987).
- Dinnel, P.A., J.M. Link et Q.J. Stober, « Improved Methodology for a Sea Urchin Sperm Cell Bioassay for Marine Waters », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16:23-32 (1987).
- Dinnel, P.A., J.M. Link, Q.J. Stober, M.W. Letourneau et W.E. Roberts, « Comparative Sensitivity of Sea Urchin Sperm Bioassays to Metals and Pesticides », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18:748-755 (1989).
- Dinnel, P.A., G.G. Pagano et P.S. Oshida, « A Sea Urchin Test System for Marine Environmental Monitoring », p. 611-619, dans *Echinoderm Biology. Proc. Sixth Internat. Echinoderm Conf.*, R.D. Burke, P.V. Mladenov, P. Lambert et R.L. Parsley (dir.), du 23 au 28 août 1987, Victoria, A.A. Balkema, Rotterdam, Pays-Bas (1988).
- Dinnel, P.A., Q.J. Stober, S.C. Crumley et R.E. Nakatani, « Development of a Sperm Cell Toxicity Test for Marine Waters », p. 82-98, dans *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference*, J.G. Pearson, R.B. Foster et W.E. Bishop (dir.), ASTM STP No. 766, Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphie (PA) (1982).
- Doe, K., et P. Jackman, communication personnelle, Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique, Environnement Canada, Moncton (N.-B.) (2008).
- Drzewina, A., et G. Bohn, « Action de l'argent métallique sur le sperme et les larves d'Oursin », *C.R. Acad. Sci. Paris*, 182:1651-1652 (1926).
- EC (Environnement Canada), *Méthode d'essai biologique : Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel*, rapport SPE 1/RM/9, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.) (1990a).
- _____, *Méthode d'essai biologique : Essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines (Gasterosteus aculeatus)*, rapport SPE 1/RM/10, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.) (1990b).
- _____, *Méthode d'essai biologique : Essai de létalité aiguë sur Daphnia spp.*, rapport SPE 1/RM/11, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.) (1990c).
- _____, Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence, rapport SPE 1/RM/12, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.) (1990d).
- _____, *Interim Contaminant Testing Guidelines for Ocean Disposal - Pacific & Yukon Region*, rapport préliminaire, Conservation et Protection, North Vancouver (C.-B.) (1990e).
- _____, *Interim Contaminant Testing Guidelines for Ocean Disposal - Atlantic Region*, rapport préliminaire, Conservation et Protection, Dartmouth (N.-É.) (1990f).
- _____, *Méthode d'essai biologique : Essai de reproduction et de survie sur le cladocère Ceriodaphnia dubia*, rapport SPE 1/RM/21, Conservation et Protection, Ottawa, (Ont.) (1992a).
- _____, *Méthode d'essai biologique : Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule*, rapport SPE 1/RM/22, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.) (1992b).
- _____, *Méthode d'essai biologique : Essai de fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)*, rapport SPE 1/RM/27, Conservation et Protection, Ottawa (Ont.) (1992c).
- _____, 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, Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1994).

- _____, Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats, rapport SPE 1/RM/34, Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1999).
- _____, Revised Procedures for Adjusting Salinity of Effluent Samples for Marine Sublethal Toxicity Testing Conducted under Environmental Effects Monitoring (EEM) Programs, rapport inédit, Section de l'élaboration des méthodes et des applications, Centre de technologie environnementale, Ottawa (Ont.) (2001).
- _____, *Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité*, rapport SPE 1/RM/46, Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (2005).
- ERCEES (ERC Environmental and Energy Services), *Standard Operating Procedure, Echinoderm Sperm-fertilization Bioassay*, manuscrit, San Diego (CA) (1990).
- Esposito, A., M. Cipollara, G. Corsale, E. Ragucci, G.G. Gordiano et G. Pagano, « The Sea Urchin Bioassay in Testing Pollutants », p. 447-455, dans *Strategies and Advanced Techniques for Marine Pollution Studies: Mediterranean Sea*, C.S. Giam et J.J.-M. Dou (dir.), NATO ASI Series, Vol. G9, Springer-Verlag, Berlin, Allemagne (1986).
- EVS (E.V.S. Consultats), *Sand Dollar Bioassay. Sea Urchin Bioassay*, protocole, North Vancouver (C.-B.) (1989).
- Geisy, J.P., et R.A. Hoke, « Freshwater Sediment Toxicity Bioassessment: Rationale for Species Selection and Test Design », *J. Great Lakes Res.*, 15:539-569 (1989).
- GITA (Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique), *The Halifax Sea Urchin Fertilization Test Workshop*, du 30 avril au 2 mai 1990, rapport non catalogué, Conservation et Protection, Environnement Canada, Dartmouth (N.-É.) (1991).
- Gossett, R., R. Baird, K. Christensen et S. B. Weisberg, « Making Performance-Based Chemistry Work: How We Created Comparable Data Among Laboratories as Part of a Southern California Marine Regional Assessment », *Environ. Monit. Assess.*, 81:269-287 (2003).
- Gouvernement du Canada, *Règlement sur l'immersion en mer*, DORS/2001-275, en application de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*, *Gazette du Canada*, Partie II, 135 (17):1655-1657, 1^{er} août 2001, Ottawa (Ont.) (2001).
- Greenwood, P.J., et T. Bennett, « Some Effects of Temperature-salinity Combinations on the Early Development of the Sea Urchin *Parechinus angulosus* (Leske). Fertilization », *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 51:119-131 (1981).
- Himmelman, J.H., H. Guderley, G. Vignault, G. Drouin et P.G. Wells, « Response of the Sea Urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, to Reduced Salinities; Importance of Size, Acclimation, and Interpopulation Differences », *Can. J. Zool.*, 62:1015-1021 (1984).
- Himmelman, J.H., et D.H. Steele, « Foods and Predators of the Green Sea Urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in Newfoundland Waters », *Mar. Biol.*, 9:315-322 (1971).
- Hoadley, L., « Certain Effects of the Salts of the Heavy Metals on the Fertilization Reaction in *Arbacia punctulata* », *Biol. Bull.*, 44 (6):255-279 (1923).
- Ives, M., communication personnelle, Tidepool Scientific Software (2008).
- _____, communication personnelle, Tidepool Scientific Software (2010).
- Jackman, P., communication personnelle, Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique, Environnement Canada, Moncton (N.-B.) (2008).

- Jackman, P., et K. Doe, *Research to Improve the Echinoid Sediment Porewater Toxicity Test: Progress Report for Year 1 to Year 3 with Recommendations*, rapport inédit préparé par le Centre des sciences de l'environnement de l'Atlantique [Moncton (N.-B.)] pour le Programme d'immersion en mer d'Environnement Canada [Hull (Qué.)] (2004).
- _____, *Research to Improve the Echinoid Sediment Porewater Toxicity Test: Progress Report for Year 4 to Year 5 with Recommendations*, rapport inédit préparé par le Centre des sciences de l'environnement de l'Atlantique [Moncton (N.-B.)] pour le Programme d'immersion en mer d'Environnement Canada [Hull (Qué.)] (2006).
- Johnson, A., P. Halliman, K. Seiders et P. Davis, *Quality of Grays Harbor Pulp and Paper Mills Effluents, March-June 1989*, Washington State Dept. Ecology, Environ. Investigations and Lab. Services Program, Olympia (WA) [cité dans NCASI (1992)] (1990).
- Jonczyk, E., K.G. Doe, P.G. Wells et S.G. Yee, « Technical Evaluation of the Sea Urchin Fertilization Test: Proceedings of a Workshop in Dartmouth, Nova Scotia », p. 323-330, dans *Proc. Seventeenth Annual Aquatic Toxicity Workshop: Nov. 5-7, 1990*, P. Chapman, F. Bishay, E. Power, K. Hall, L. Harding, D. McLeay, M. Nassichuk et W. Knapp (dir.), Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques n° 1774, Pêches et Océans Canada, Vancouver (C.-B.) (1991).
- Jonczyk, E., et K. Holtze, communication personnelle, AquaTox Testing and Consulting Inc., Guelph (Ont.) (2008).
- Karnofsky, D.A., et E.B. Simmel, « Effects of Growth-inhibiting Chemicals on the Sand-dollar Embryo, *Echinarachnius parma* », *Prog. Exp. Tumor Res.*, 3:254-295 (1963).
- Kobayashi, N., « Fertilized Sea Urchin Eggs as an Indicatory Material for Marine Pollution Bioassay, Preliminary Experiments », *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 18(6):379-406 (1971).
- _____, « Comparative Sensitivity of Various Developmental Stages of Sea Urchins to Some Chemicals », *Marine Biol.*, 58:163-171 (1980).
- _____, « Marine Ecotoxicological Testing with Echinoids », p. 341-405, dans *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*, vol. I, G. Persoone, E. Jaspers et C. Claus (dir.), State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgique (1984).
- LCPE (*Loi canadienne sur la protection de l'environnement*), « Immersion en mer », Partie 7, Section 3, articles 122-127, et Annexes 5 et 6, Lois du Canada, ch. 3 (1999).
- Lillie, F.R., « Studies of Fertilization. X. The Effects of Copper Salts on the Fertilization Reaction in *Arbacia* and A Comparison of Mercury Effects », *Biol. Bull.*, 41:125-143 (1921).
- Long, E.R., M.F. Buchman, S.M. Bay, R.J. Breteler, R.S. Carr, P.M. Chapman, J.E. Hose, A.L. Lissner, J. Scott et D.A. Wolfe, « Comparative Evaluation of Five Toxicity Tests with Sediments from San Francisco Bay and Tomales Bay, CA », *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:1193-1214 (1990).
- McCaffrey, L., « The Role of Toxicity Testing in Prosecutions Under Section 14 (1)(a) of the *Environmental Protection Act*, 1971 and Section 32 (1) of the *Ontario Water Resources Act* », p. 15-22, dans *Proc. Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop*, Hamilton (Ont.), du 7 au 9 novembre 1978, Rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer n° 862, Ottawa (Ont.) (1979).
- McCormick, J.M., et J.V. Thiruvathukal, *Elements of Oceanography*, W.B. Saunders Co. (PA) (1976).
- McGibbon, S., et A.G.S. Moldan, « Routine Toxicity Testing of Toxicants Using a Sea Urchin Gamete Bioassay », *Mar. Pollut. Bull.*, 17(2):68-72 (1986).

- McLeay, D., Plan for Further Work by ALET and PYLET Related to the Development, Standardization, and Validation of an Echinoid Embryo/Larval Sediment-Contact Test as an Environment Canada Reference Method, rapport inédit préparé par McLeay Environmental Ltd. [Victoria (C.-B.)] pour la Section des méthodes biologiques, Environnement Canada [Ottawa (Ont.)], comprenant du texte additionnel rédigé par Leana Van der Vliet au nom des membres du groupe de travail sur les échinides (2007).
- McLeay, D.J., et J.B. Sprague, Ten-day Test for Sediment Lethality Using Marine or Estuarine Infaunal Amphipods: Review of Literature for Subject-specific Information of Value in Developing Environment Canada's Biological Test Method, rapport manuscrit préparé pour le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique, West Vancouver (C.-B.), McLeay Associates Ltd. (1991).
- Meador, J.P., B.D. Ross, P.A. Dinnel et S.J. Picquelle, « An Analysis of the Relationship Between a Sand-dollar Embryo Elutriate Assay and Sediment Contaminants from Stations in an Urban Embayment of Puget Sound, Washington », *Mar. Environ. Res.*, 30:251-272 (1990).
- MECAS (MEC Analytical Systems, Inc.), *Echinoderm Sperm Cell Toxicity Test Protocol*, Tiburon (CA) (1990).
- MECB (Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique), *Echinoderm Sperm Inhibition Bioassay*, manuscrit inédit, Aquatic Toxicity Lab. (1990).
- Meinkoth, N.A., The Audubon Society Field Guide to North American Seashore Creatures, A.A. Knopf, New York (NY) (1981).
- Miller, J., Inter-Laboratory Validation Study for the Improvement of Environment Canada's Echinoid Fertilization Method (EPS 1/RM/27) for Porewater Testing, rapport inédit préparé par Miller Environmental Sciences Inc. [King City (Ont.)] pour la Section des méthodes biologiques, Environnement Canada [Ottawa (Ont.)] (2008).
- Miller, J., E. Jonczyk, D. Hart et G.R. Craig, *Fertilization Assay with Echinoids: Interlaboratory Evaluation of Test Options*, rapport présenté à Environnement Canada, Beak Consultants Ltd., Brampton (Ont.) (1992).
- MPO (Ministère des Pêches et des Océans), Loi sur les pêches, Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers, *Gazette du Canada*, Partie II, vol. 126, n° 11 (1992).
- _____, Loi sur les pêches, Règlement sur les effluents des mines de métaux, *Gazette du Canada*, Partie II, vol. 136, n° 13 (2002).
- Muchmore, D., et D. Epel, « The Effects of Chlorination of Wastewater on Fertilization in Some Marine Invertebrates », *Mar. Biol.*, 19:93-05 (1973).
- Mudroch, A., et S.D. Macknight, *CRC Handbook of Techniques for Aquatic Sediments Sampling*, CRC Press, Inc., Boca Raton (FL) (1991).
- Nacci, D., E., Jackim et R. Walsh, « Comparative Evaluation of Three Rapid Marine Toxicity Tests: Sea Urchin Early Embryo Growth Test, Sea Urchin Sperm Cell Toxicity Test and Microtox », *Environ. Toxicol. Chem.*, 5:521-526 (1986).
- NCASI (National Council of the Paper Industry for Air and Stream Improvement, Inc.), *NCASI Echinoderm Sperm/egg Bioassay Test Protocol*, manuscrit, Anacortes (WA) (1991).
- _____, « Marine Chronic Bioassays — Technical Evaluations and Effluent Responses with the Echinoderm Sperm/egg Test », *Tech. Bull.*, No. 627, New York (NY) (1992).
- NRC (National Research Council), *Laboratory Animal Management. Marine Invertebrates*, Committee on Marine Invertebrates, Inst. Lab. Animal Resources, U.S. National Research Council, National Academy Press, Washington (DC) (1981).
- NWAS (Northwestern Aquatic Sciences), *Test Protocol, Echinoderm Sperm Fertilization Test*, protocole n° NAS-XXX-SP/DE, Newport (OR) (1990).

- Osborne, J., et C. Leeder, « Acute and Chronic Toxicity of Base Oil and Cuttings from Three Wells Drilled in the Beaufort Sea », p. 481-494, dans *Drilling Wastes*, F.R. Engelhardt, J.P. Ray et A.H. Gillam (dir.), Elsevier Science Publishers Ltd., Londres (1989).
- Oshida, P.S., T.K. Goochey et A.J. Mearns, « Effects of Municipal Wastewater on Fertilization, Survival, and Development of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* », p. 389-402, dans *Biological Monitoring of Marine Pollutants*, J. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurberg et W.B. Verberg (dir.), Academic Press, New York (NY) (1981).
- Pagano, G., Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, E. Ragucci et G.G. Giordano, « pH-induced Changes in Mitotic and Developmental Patterns in Sea Urchin Embryogenesis. I. Exposure of Embryos. II. Exposure of Sperm », *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 5:101-112; 113-121 (1985).
- Pagano, G., M. Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, E. Ragucci, G.G. Giordano et N.M. Trieff, « The Sea Urchin: Bioassay for the Assessment of Damage from Environmental Contaminants », p. 66-92, dans *Community Toxicity Testing*, J. Cairns, Jr. (dir.), ASTM STP No. 920, Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphie (PA) (1986).
- Pagano, G.A. Esposito, P. Bove, M. de Angelis, A. Rota et G.G. Giordano, « The Effects of Hexavalent and Trivalent Chromium on Fertilization and Development in Sea Urchins », *Environ. Res.*, 30:442-452 (1983).
- Pastorok, R.A., et D.S. Becker, « Comparative Sensitivity of Bioassays for Assessing Sediment Toxicity in Puget Sound », p. 431-436, dans *Oceans '89, An International Conference Addressing Methods for Understanding the Global Ocean*, du 18 au 21 septembre 1989, Seattle (WA), IEEE Pub. No. 89CH2780-5, Marine Technol. Soc. et Oceanic Engng. Soc., Inst. Electrical and Electronics Engineers (1989).
- Pickard, J., communication personnelle, Cantest Ltd., Burnaby (C.-B.) (2008).
- Pickard, J., L.A. Stavroff, M. Wilson, P. Howes, C. Sullivan et C. Eickhoff, « The Effect of Artificial Sea Salt Preparation on *Strongylocentrotus purpuratus* Fertilization Success », dans *Proc. 34th Annual Aquatic Toxicity Workshop*, du 30 septembre au 3 octobre 2007, K.A. Kidd, R. Allen Jarvis, K. Haya, K. Doe et L.E. Burridge (dir.), Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques n° 2793, Halifax (N.-É.) (2008).
- 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).
- Rue, W.J., J.A. Fava et D.R. Grothe, « A Review of Inter- and Intralaboratory Effluent Toxicity Test Method Variability », p. 190-203, dans *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation: 10th volume*, W.J. Adams, G.A. Chapman et W.G. Landis (dir.), ASTM STP 971, American Society for Testing and Materials, Philadelphie (PA) (1988).
- Sager, J.C., et C. McFarlane « Radiation », p. 1-30, dans *Plant Growth Chamber Handbook*, R.W. Langhans et T.W. Tibbits (dir.), North Central Regional Research Publication No. 340, Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station Special Report No. 99, Iowa State University of Science and Technology, Ames (IA) (1997).
- Schiewe, M.H., E.G. Hawk, D.I. Actor et M.M. Krahn, « Use of a Bacterial Bioluminescence Assay to Assess Toxicity of Contaminated Marine Sediments », *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, 42:1244-1248 (1985).
- Schimmel, S.C., G.E. Morrison et M.A. Heber, « Marine Complex Effluent Toxicity Program: Test Sensitivity, Repeatability and Relevance to Receiving Water Toxicity », *Environ. Toxicol. Chem.*, 8:739-746 [*Arbacia punctulata*] (1989).

- Scroggins, R., W. Berry, B. Hoke, B. Milligan et D. Morrisey, « Regulatory Applications of Porewater Toxicity Testing », p. 263-283, dans R.S. Carr et M. Nipper (dir.), *Porewater Toxicity Testing: Biological, Chemical, and Ecological Considerations*, Society of Environmental Toxicology and Chemistry Press, Pensacola (FL) (2003).
- Sergy, G., *Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environment Protection*, Conservation et protection, Environnement Canada, Edmonton (Alb.) (1987).
- Servizi, J.A., et R.W. Gordon, « Detoxification of TMP and CTMP Effluents Alternating in a Pilot Scale Aerated Lagoon », *Pulp and Paper Can.*, 87 (11):T404-409 (1986).
- Shiu, W.Y., A. Maijanen, A.L.Y. Ng et D. Mackay, « Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: II. Multicomponent Systems — Hydrocarbon Mixtures and Petroleum Products », *Environ. Toxicol. Chem.*, 7:125-137 (1988).
- Sprague, J.B., et D.J. McLeay, *Echinoid Fertilization Assays. Tabulation of Methods Used by Major Groups and Authors*, manuscrit, Sprague Assoc. Ltd., Guelph (Ont.) (1991).
- Starr, M., Examen des mécanismes de coordination entre la ponte de certains invertébrés marins et la poussée printanière du phytoplancton, thèse de doctorat, Université Laval, Québec (1990).
- Starr, M., J.H. Himmelman et J.-C. Therriault, « Direct Coupling of Marine Invertebrate Spawning with Phytoplankton Blooms », *Science*, 247:1071-1074 (1990).
- Storer, T.A., R.L. Usinger, R.C. Stebbins et J.W. Nybakken, *General Zoology*, 6^e éd., McGraw-Hill Book Co., New York (NY) (1979).
- Strathmann, M.F., « Phylum Echinodermata, Class Echinoidea », ch. 25, dans *Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast. Data and Methods for the Study of Eggs, Embryos, and Larvae*, Univ. of Washington Press, Seattle (WA) (1987).
- Thurman, H.V., *Introductory Oceanography*, Charles E. Merrill Pub. Co., Columbus (OH) (1975).
- True, C.J., et A.A. Heyward, « Relationships Between Microtox Test Results, Extraction Methods, and Physical and Chemical Compositions of Marine Sediment Samples », *Toxicity Assessment: An International Journal*, 5:29-45 (1990).
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), *Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. Standard Evaluation Procedure*, EPA-540/9-85-006, Hazard Evaluation Division, Washington (DC) (1985).
- _____, « Sea urchin (*Arbacia punctulata*) Fertilization Test Method 1008 », p. 239-272, dans *Short-term Methods of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms*, C.I. Weber, W.B. Horning II, D.J. Klemm, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, E.L. Robinson, J.R. Menkedick et F.A. Kessler (dir.), EPA/600/4-87/028, Cincinnati (OH) (1988).
- _____, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms* (2^e éd.), EPA/600/4-89/001 [préparé par C.I. Weber, W.H. Peltier, R.J. Norberg-King, W.B. Horning, F.A. Kessler, J.R. Menkedick, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, D.J. Klemm, W.H. Pickering, E.L. Robinson, J. Lazorchak, L.J. Wymer et R.W. Freyberg], Cincinnati (OH) (1989).
- _____, *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations. Phase I Toxicity Characterization Procedures (Second edition)* [révisé par T.J. Norberg-King, D.I. Mount, E.J. Durhan, G.T. Ankley, L.P. Burkhard, J.R. Amato, M.T. Lukaszewicz, M.K. Schubauer-Berigan et L. Anderson-Carnahan] EPA/600/6-91/003, National Effluent Toxicity Assessment Center Tech. Rept 18-90, Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, Duluth (MN) (1991a).

- _____, *Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I* [préparé par T.J. Norberg-King, D.I. Mount, J.R. Amato, D.A. Jensen et J.A. Thompson], EPA/600/6-91/005, National Effluent Toxicity Assessment Center Tech. Rept. 05-91, Office of Research and Development, Duluth (MN) (1991b).
- _____, « Sea Urchin, *Arbacia punctulata*, Fertilization Test Method 1008.0 », p. 300-340, dans *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms*, EPA/600/4-91/003, 2^e éd., Cincinnati (OH) (1994).
- _____, « Purple Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* and Sand Dollar, *Dendraster excentricus* Fertilization Test Method », p. 389-465, dans *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to West Coast Marine and Estuarine Organisms*, EPA/600/R-95/136, Washington (DC) (1995).
- _____, « Sea Urchin, *Arbacia punctulata*, Fertilization Test Method 1008.0 », p. 293-331, dans *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms*, EPA-821-R-02-014, 3^e éd., Washington (DC) (2002).
- van Aggelen, G.C., *Echinoderm Toxicity Testing: A Chronic Marine Bioassay*, manuscrit inédit, Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Data Standards Group, North Vancouver (C.-B.) (1988).
- _____, communication personnelle, Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique (1992).
- Wells, P.G., « L'oursin commun (*Strongylocentrotus droebachiensis*) utilisé comme organisme de test biologique et comme indicateur biologique de la pollution dans les eaux côtières canadiennes », *Bulletin de la lutte contre les déversements*, 7(5):114-120, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) (1982).
- _____, « Marine Ecotoxicological Tests with Zooplankton », p. 215-256, dans *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*, G. Persoone, E. Jaspers et C. Claus (dir.), Vol. I., State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgique (1984).
- Zajdlik & Associates Inc., *Guidance for Statistical Analysis of Ecotoxicological Data Derived using Environment Canada Standardized Biological Test Methods* (2010).
- Zajdlik, B., communication personnelle, Zajdlik & Associates Inc. (2010).

Méthodes d'essai biologique et documents d'orientation publiés par l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada^a

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
A. Méthodes d'essai biologique universelles			
Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/9	Juillet 1990	Mai 1996 et mai 2007
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 du cladocère <i>Ceriodaphnia dubia</i>	SPE 1/RM/21 2 ^e édition	Février 2007	—
Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule	SPE 1/RM/22 2 ^e édition	Février 2011	—
Essai de toxicité sur la bactérie luminescente <i>Photobacterium phosphoreum</i>	SPE 1/RM/24	Novembre 1992	—
Essai d'inhibition de la croissance d'une algue d'eau douce	SPE 1/RM/25 2 ^e édition	Mars 2007	—
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 globuleux et oursins plats)	SPE 1/RM/27 2 ^e édition	Février 2011	—
Essai de toxicité sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique	SPE 1/RM/28 2 ^e 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	—

^a Ces documents sont vendus à l'adresse suivante : Services des communications, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0H3, Canada. Pour en commander des copies papier, prière d'envoyer un courriel à epspubs@ec.gc.ca. Il est également possible de les télécharger gratuitement en format PDF à partir de l'adresse suivante : <http://www.ec.gc.ca/faunescience-wildlifescience/default.asp?lang=Fr&n=0BB80E7B-1>. Pour obtenir de plus amples renseignements ou pour formuler des commentaires, prière de communiquer avec le chef de la Section des méthodes biologiques, 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
A. Méthodes d'essai biologique universelles (suite)			
Essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole <i>Hyalella 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 2 ^e édition	Janvier 2007	—
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	Juin 2004	Juin 2007
Essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/45	Février 2005	Juin 2007
Essai de mesure de la survie et de la reproduction de collemboles exposés à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/47	Septembre 2007	—
B. Méthodes de référence^b			
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 2 ^e édition	Mai 2007	—
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez <i>Daphnia magna</i>	SPE 1/RM/14 2 ^e 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	—
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	—

^b Dans cette collection de documents, on définit une *méthode de référence* comme étant une méthode d'essai biologique spécifique en vue de la réalisation d'un essai toxicologique, 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
C. Documents d'orientation			
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 de contrôle 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 applicables aux essais d'écotoxicité	SPE 1/RM/46	Mars 2005	Juin 2007
Procédure de stabilisation du pH pendant un essai de létalité aiguë d'un effluent d'eau usée chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/50	Mars 2008	—
Renseignements de base et conseils supplémentaires pour l'étude de la létalité aiguë d'un effluent d'eau usée pour la truite arc-en-ciel	—	Mars 2008	—

Membres du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (en octobre 2009)

Gouvernement fédéral, Environnement Canada

Suzanne Agius
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Qué.)

Adrienne Bartlett
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ont.)

Christian Blaise
Centre Saint-Laurent
Montréal (Qué.)

Joy Bruno
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Craig Buday
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Ken Doe
Laboratoire des essais environnementaux
de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

Garth Elliott
Laboratoire des essais environnementaux
des Prairies et du Nord
Edmonton (Alb.)

François Gagné
Recherche sur les écosystèmes fluviaux
Montréal (Qué.)

Patricia Gillis
Direction de la recherche sur l'étude des impacts
sur les écosystèmes aquatiques
Burlington (Ont.)

Manon Harwood
Laboratoire des essais environnementaux du Québec
Montréal (Qué.)

Dale Hughes
Laboratoire des essais environnementaux
de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

Paula Jackman
Laboratoire des essais environnementaux
de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

Nancy Kruper
Laboratoire des essais environnementaux
des Prairies et du Nord
Edmonton (Alb.)

Michelle Linszen-Sauvé
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Danielle Milani
Direction de la recherche sur l'étude des impacts
sur les écosystèmes aquatiques
Burlington (Ont.)

Warren Norwood
Direction de la recherche sur la protection
des écosystèmes aquatiques
Burlington (Ont.)

Heather Osachoff
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Joanne Parrott
Direction de la recherche sur la protection
des écosystèmes aquatiques
Burlington (Ont.)

Linda Porebski
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Qué.)

Juliska Princz
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

Jessica Rahn
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

Grant Schroeder
Laboratoires des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Richard P. Scroggins
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

Rachel Skirrow
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Troy Steeves
Laboratoire des essais environnementaux
de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

David Taillefer
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Qué.)

Lisa Taylor (présidente)
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

Sylvain Trottier
Laboratoire des essais environnementaux du Québec
Montréal (Qué.)

Graham van Aggelen
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Leana Van der Vliet
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

Brian Walker
Laboratoire des essais environnementaux du Québec
Montréal (Qué.)

Peter Wells (chercheur émérite)
Service de la conservation de l'environnement
Dartmouth (N.-É.)

Gouvernement fédéral, Pêches et Océans Canada

Robert Roy
Institut Maurice-Lamontagne
Mont-Joli (Qué.)

Gouvernement fédéral, Ressources naturelles Canada

Melissa Desforges
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales,
CANMET
Ottawa (Ont.)

Philippa Huntsman-Mapila
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales,
CANMET
Ottawa (Ont.)

Morgan King
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales,
CANMET
Ottawa (Ont.)

Carrie Rickwood
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales,
CANMET
Ottawa (Ont.)

Bernard Vigneault
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales,
CANMET
Ottawa (Ont.)

Gouvernement provincial

Richard Chong-Kit
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Etobicoke (Ont.)

Kim Hunter
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Etobicoke (Ont.)

David Poirier
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Etobicoke (Ont.)

Julie Schroeder
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Toronto (Ont.)

Trudy Watson-Leung
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Etobicoke (Ont.)

Établissements privés de recherche/autres

Christian Bastien
Centre d'expertise en analyse environnementale
du Québec
Ste-Foy (Qué.)

Barbara Bayer
Manitoba Technology Centre, ALS Laboratory
Winnipeg (Man.)

Mary Moody
Saskatchewan Research Council
Saskatoon (Sask.)

Jim Somers
Conseil canadien des normes
Ottawa (Ont.)

Administration centrale et bureaux régionaux d'Environnement Canada**Administration centrale**

351, boulevard Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Gatineau (Qué.)
K1A 0H3

Région de l'Atlantique

Queen Square, 15^e étage
45, chemin Alderney
Dartmouth (N.-É.)
B2Y 2N6

Région du Québec

105, rue McGill, 8^e étage
Montréal (Qué.)
H2Y 2E7

Région de l'Ontario

4905, rue Dufferin, 2^e étage
Downsview (Ont.)
M3H 5T4

Région des Prairies et du Nord

Twin Atria n^o 2, Bureau 210,
4999, 98^e Avenue
Edmonton (Alb.)
T6B 2X3

Région du Pacifique et du Yukon

401, rue Burrard
Vancouver (C.-B.)
V6C 3S5

Examen des différentes méthodes employées précédemment par des auteurs et organismes dans des essais sur la fécondation chez les oursins globuleux et les oursins plats

L'examen se fonde sur les documents dont disposaient les auteurs en mars 1992. On a omis les éléments suivants des méthodes parce qu'ils sont communs à tous les essais ou parce qu'ils pourraient facilement être adaptés à toutes les méthodes examinées ci-après.

- **Essais sans renouvellement** – Tout le processus d'exposition et de fécondation a été réalisé dans de petits récipients, sans renouvellement des solutions.
- **Substance d'essai** – Toutes les méthodes conviendraient à l'essai de substances chimiques à l'état pur, de préparations, d'eaux usées ou d'échantillons d'eau de mer, en ajustant la salinité comme il est de pratique courante dans les méthodes examinées.
- **Paramètres** – Le paramètre habituel est l'inhibition de la fécondation par rapport au témoin. Toutes les méthodes semblent convenir à l'estimation de la CI_p et de la CSEO/CMEO au moyen des techniques statistiques courantes.

Détails au sujet des auteurs, des organismes ou des méthodes.

Beak, 1988. Société canadienne d'experts-conseils (v. Références).

EVS, 1989. Société canadienne d'experts-conseils (v. Références).

MECB, 1990. Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, qui comprend van Aggelen, 1988.

GITA, 1991. Comprend cette source et Jonczyk et coll., 1991.

Dinnel et coll., 1987. Avec ses collaborateurs, Dinnel constitue une école ou propose une approche importante pour les essais avec des échinides.

USEPA, 1988. Fait partie des méthodes publiées par le bureau de Cincinnati de l'USEPA.

ASTM, 1990. Sous-comité chargé d'élaborer une méthode normalisée. Président : G.A. Chapman.

NCASI, 1991, 1992. Groupe de chercheurs parrainé par l'industrie des pâtes et papiers (v. Références).

USEPA (Pac. 91). Figure dans les Références, sous Chapman (1991). Méthode élaborée sur la côte du Pacifique aux fins des comparaisons interlaboratoire, qui a inspiré les documents des consultants des États-Unis (v. ci-après).

USEPA (Pac. 92). Figure dans les Références, sous Chapman (1992a). Méthode provisoire de l'USEPA élaborée sur la côte du Pacifique.

Kobayashi, 1971. Présente les premières méthodes employées par ce chercheur prolifique.

Kobayashi, 1984. Présente un synopsis des méthodes ultérieures employées par ce chercheur.

S. Calif. Project. Organisme régional de recherches sur la pollution. Figure dans les références sous Oshida et coll. (1981).

Nacci et coll., 1986. Publication citée par d'autres auteurs comme source de méthodes.

Cherr et coll., 1987. Auteurs du Bodega Marine Laboratory.

BML, 1991. Bodega Marine Laboratory de l'Université de Californie (v. Références).

ERCEES, 1990. Société d'experts-conseils de Californie (v. Références).

MECAS, 1990. Société d'experts-conseils de Californie (v. Références).

NWAS, 1990. Société d'experts-conseils de la côte Ouest des États-Unis (v. Références).

L'ordre de présentation de l'information est le suivant : 1) laboratoires au Canada; 2) principaux comités, organismes gouvernementaux, laboratoires et établissements d'enseignement (tous aux États-Unis); 3) sociétés d'experts-conseils et principaux auteurs. On a négligé les méthodes détaillées de Pagano et coll. parce que leur description n'était pas conforme aux exigences.

Abréviations apparaissant dans les tableaux de la présente annexe :

eau t/d = eau témoin/de dilution

NI = non indiqué

OG = oursin globuleux

OP = oursin plat

UV = rayons ultraviolets

1. Espèces et disponibilité des adultes

Document	Espèces et information sur l'endroit, le prélèvement et la période du frai
Beak, 1988	<i>Lytechinus pictus</i> , oursin de Californie; achat; fraie toute l'année <i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> , oursin vert; côtes atlantique, pacifique et arctique du Canada; réputé frayer de mars à avril
EVS, 1989	<i>S. purpuratus</i> , oursin violet du Pacifique; prélèvement dans des lieux non contaminés ou achat; fraie de décembre à mars <i>S. droebachiensis</i> , comme ci-dessus <i>S. franciscanus</i> , oursin rouge; océan Pacifique; fraie en avril et en mai <i>Dendraster excentricus</i> , clypéastre excentrique du Pacifique; réputé frayer à la fin du printemps et en été
MECB, 1990	<i>D. excentricus</i> ; comme ci-dessus, mais réputé frayer de juin à novembre
GITA, 1991	<i>S. droebachiensis</i> , comme ci-dessus, mais fraie de février à mars ou avril <i>L. pictus</i> , comme ci-dessus
Dinnel et coll., 1987	<i>S. purpuratus</i> , mâles laités et femelles œuvées de décembre à mars, mais plus longtemps en laboratoire <i>S. droebachiensis</i> , comme ci-dessus, mâles laités et femelles œuvées de janvier à avril, mais plus longtemps en laboratoire <i>S. franciscanus</i> , comme ci-dessus <i>D. excentricus</i> , comme ci-dessus; mâles laités et femelles œuvées de mai à octobre
USEPA, 1988	<i>Arbacia punctulata</i> , oursin violet de l'Atlantique; peut être acheté
ASTM, 1990	<i>A. punctulata</i> , comme ci-dessus <i>D. excentricus</i> , comme ci-dessus <i>S. purpuratus</i> , comme ci-dessus <i>S. droebachiensis</i> , comme ci-dessus; d'autres espèces peuvent être utilisées, au besoin
NCASI, 1991, 1992	<i>D. excentricus</i> , comme ci-dessus; fraie toute l'année, sauf de la fin décembre à la fin janvier, en modifiant les conditions de maintien en laboratoire <i>S. purpuratus</i> , fraie de janvier à juin en laboratoire <i>S. droebachiensis</i> , comme ci-dessus; aussi, de janvier à juin en laboratoire
USEPA (Pac. 91)	<i>S. droebachiensis</i> , comme ci-dessus
USEPA (Pac. 92)	<i>S. purpuratus</i> , comme ci-dessus
Kobayashi, 1971	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> , un oursin du Japon; fraie de janvier à mars <i>Anthocidaris crassispina</i> , un oursin du Japon; fraie de mai à août <i>Temnopleurus toreumaticus</i> , un oursin du Japon; fraie de juillet à octobre <i>Pseudocentrotus depressus</i> , un oursin du Japon; fraie d'octobre à novembre
Kobayashi, 1984	Identique à Kobayashi, 1971, sauf pour l'espèce non mentionnée <i>T. toreumaticus</i>

Document	Espèces et information sur l'endroit, le prélèvement et la période du frai
S. Calif. Project	<i>S. purpuratus</i> , comme ci-dessus; prélèvement à la main
Nacci et coll., 1986	<i>A. punctulata</i> , comme ci-dessus
Cherr et coll., 1987	<i>S. purpuratus</i> , comme ci-dessus
BML, 1991	<i>S. purpuratus</i> , comme ci-dessus
ERCEES, 1990	<i>S. purpuratus</i> , comme ci-dessus; prélèvement ou achat <i>A. punctulata</i> , comme ci-dessus; prélèvement ou achat <i>Lytechinus</i> sp., comme ci-dessus; prélèvement ou achat <i>D. excentricus</i> , comme ci-dessus; prélèvement ou achat
MECAS, 1990	NI
NWAS, 1990	<i>S. purpuratus</i> , comme ci-dessus <i>D. excentricus</i> , comme ci-dessus; achat au besoin

2. Maintien des adultes en laboratoire

Document	Durée	Eau	Alimentation
Beak, 1988	5 jours	eau de mer reconstituée	laitue romaine? OG : macroalgues
EVS, 1989	≤9 semaines	eau de mer courante à raison de 0,1 L/min par plateau peu profond ou en conditions statiques avec remplacement mensuel	OG : macroalgues brunes OP : zostère
MECB, 1990	NI	eau de mer courante non filtrée	OP : non alimentés
GITA, 1991	≥7 jours	Oursin vert : eau de mer courante Oursin blanc : eau de mer reconstituée	Oursin vert : macroalgues brunes Oursin blanc : varech ou laitue romaine
Dinnel et coll., 1987	NI	eau de mer courante filtrée recirculation avec filtre	OG : macroalgues OP : plancton et détrit
USEPA, 1988	NI	eau de mer filtrée, 5 L/min, pour un réservoir de 20 L contenant 20 adultes ou eau de mer reconstituée et recirculée	OG : varech ou laitue romaine
ASTM, 1990	NI	eau de mer reconstituée ou eau de mer non filtrée	OG : macroalgues et laitue romaine OP : microalgues
NCASI, 1991, 1992	NI	eau de mer non filtrée, 1-2 L/min pour un réservoir de 160 L	OP : algues cultivées et nourriture en flocons OG : macroalgues, laitue romaine
USEPA (Pac. 91)	NI	NI	NI
USEPA (Pac. 92)	NI	eau de mer filtrée, 5 L/min, ou eau de mer reconstituée et recirculée	varech ou laitue romaine
Kobayashi, 1971	≤2 jours	NI	NI
Kobayashi, 1984	≤2 jours	NI	NI
S. Calif. Project	NI	eau de mer recirculée	algues brunes
Nacci et coll., 1986	NI	NI	NI
Cherr et coll., 1987	NI	eau de mer courante	macroalgues
BML, 1991	NI	NI	NI
ERCEES, 1990	NI	eau de mer remplacée chaque semaine	algue géante
MECAS, 1990	0-2 jours	eau de mer courante	NI
NWAS, 1990	jours/mois	eau de mer courante ou partiellement recirculée	OG : varech ou laitue OP : plancton et détrit

3. Conditions de maintien des adultes

Document	Espèces	Température (°C)	Salinité (g/kg)	Oxygène (% sat.)	Éclairage
Beak, 1988	<i>Lytechinus anamesus</i>	15	30	NI	NI
EVS, 1989	différentes espèces d'OG	~10	28	pierres de barbotage	obscurité constante
	<i>D. excentricus</i>	15	28		photopériode
MECB, 1990		NI	27-30	NI	NI
GITA, 1991	<i>S. droebachiensis</i>	9	30	NI	NI
	<i>L. pictus</i>	15	30	NI	NI
Dinnel et coll., 1987	<i>Strongylocentrotus</i>	naturelle			
	<i>D. excentricus</i>	de saison	≥27	NI	NI
USEPA, 1988	<i>A. punctulata</i>	15 ± 3	30	NI	NI
ASTM, 1990	<i>Strongylocentrotus</i>	8-10	25-35	50-100 %	NI
	<i>D. excentricus</i>	12-14	25-35	50-100 %	NI
	<i>A. punctulata</i>	15	25-35	50-100 %	intense
NCASI, 1991, 1992	<i>Strongylocentrotus</i> ,	7-14	NI	NI	ambient
	<i>D. excentricus</i>				
USEPA (Pac. 91)	<i>S. purpuratus</i>	NI	NI	NI	NI
USEPA (Pac. 92)	<i>S. purpuratus</i>	12 (10-14)	>30 (idéale. 32)	NI	NI
Kobayashi, 1971	NI	NI	NI	NI	NI
Kobayashi, 1984	NI	NI	NI	NI	NI
S. Calif. Project	<i>S. purpuratus</i>	12	NI	NI	NI
Nacci et coll., 1986		NI	NI	NI	NI
Cherr et coll., 1987		NI	NI	NI	NI
BML, 1991		NI	NI	NI	NI
ERCEES, 1990		NI	NI	NI	NI
MECAS, 1990		12	NI	NI	NI
NWSA, 1990	<i>S. purpuratus</i> ,	10 ± 2	≥25	NI	12 h de clarté
	<i>D. excentricus</i>				12 h d'obscurité

4. Eau témoin/de dilution

Document	Eau et traitement recommandés
Beak, 1988	eau désionisée et sels de mer
EVS, 1989	eau de mer non contaminée, filtrée (pores de 1 µm); stérilisation aux UV facultative
MECB, 1990	eau de mer
GITA, 1991	eau désionisée et sels de mer ou eau de mer filtrée (pores de 0,45 µm)
Dinnel et coll., 1987	eau de mer filtrée (pores de 5 µm) (charbon activé facultatif) ou recirculation avec filtre
USEPA, 1988	eau désionisée et sels de mer ou saumure; eau de mer comme témoin supplémentaire possible
ASTM, 1990	eau reconstituée avec des sels de mer ou une préparation, filtrée (pores de 0,45 µm), matières organiques totales et total des solides en suspension : ≤5 mg/L; stérilisation aux UV lorsque des pathogènes sont probables; taux de fécondation requis de 70 % lorsque les spermatozoïdes sont maintenus dans l'eau pendant 1 h
NCASI, 1991 et 1992	eau de mer filtrée (pores de 1 µm), stérilisée aux UV, aérée et conservée 0 h
USEPA (Pac. 91)	eau de mer filtrée (pores de 1 µm)
USEPA (Pac. 92)	eau de mer naturelle ou reconstituée, de préférence avec de la saumure
Kobayashi, 1971	NI; probablement de l'eau de mer
Kobayashi, 1984	NI; probablement de l'eau de mer
S. Calif. Project	NI
Nacci et coll., 1986	saumure préparée avec de l'eau de mer et diluée avec de l'eau distillée pour obtenir une salinité de 30 g/kg
Cherr et coll., 1987	eau de mer filtrée (pores de 0,45 µm)
BML, 1991	eau de mer filtrée et stérilisée aux UV
ERCEES, 1990	eau de mer renouvelée chaque semaine et filtrée (pores de 20 µm et 5 µm)
MECAS, 1990	eau de mer filtrée (pores de 0,45 µm)
NWAS, 1990	eau de mer non filtrée, ajustée avec de l'eau désionisée pour obtenir une salinité de 32 g/kg

5. Température et salinité pendant l'essai

Document	Température (°C)	Salinité (g/kg) et méthode d'ajustement
Beak, 1988	20 ± 1	30 ± 2
EVS, 1989	15	ajustée avec des sels jusqu'à une salinité non précisée, lorsque l'essai porte sur des échantillons d'eau de mer; non ajustée lorsque l'essai porte sur des échantillons d'eau douce
MECB, 1990	10	NI
GITA, 1991	20 ± 1	30 ± 2
Dinnel et coll., 1987	OG : 8-10 OP : 12-16	30 ± 3; ajustée avec des sels de mer ou de l'eau désionisée
USEPA, 1988	20 ± 1	30 ± 2; salinité de l'effluent ajustée au besoin
ASTM 1990	12, mais 20 pour <i>A. punctulata</i> , et ≤2 °C d'écart entre les récipients	>25 et <32, à 1 g/kg près du témoin; salinité recommandée de 30; ajustée avec de la saumure ou des sels
NCASI, 1991, 1992	12	30; salinité des solutions d'essai ajustée avec de la saumure ou des sels
USEPA (Pac. 91)	12	32 ± 1
USEPA (Pac. 92)	12 ± 1	32 ± 2; salinité des échantillons ajustée à 32
Kobayashi, 1971	NI	NI; salinité des échantillons de faible salinité ajustée avec de la saumure ou par ébullition
Kobayashi, 1984	NI	NI
S. Calif. Project	NI	NI; apparemment non ajustée; salinité de 31-32,6 pour certains essais
Nacci et coll., 1986	NI	NI
Cherr et coll., 1987	NI	NI
BML, 1991	15	32; salinité des échantillons et de l'eau ajustée au besoin
ERCEES, 1990	« appropriée »	NI; ajustée avec de la saumure ou de l'eau désionisée au besoin
MECAS, 1990	12 ± 1	30 ± 2; salinité des solutions d'essai ajustée avec de la saumure ou de l'eau de source
NWAS, 1990	12 ± 1	32 ± 2; salinité des échantillons ajustée avec de la saumure au besoin

6. Oxygène dissous et éclairage pendant l'essai

Document	OD au début (% de saturation) et ajustement	Éclairage
Beak, 1988	NI	éclairage normal du laboratoire, flux nominal de 1 100 lux
EVS, 1989	aération suffisante pour obtenir une teneur acceptable	NI
MECB, 1990	NI	NI
GITA, 1991	NI	éclairage normal du laboratoire, flux nominal de 1 100 lux
Dinnel et coll., 1987	NI	NI
USEPA, 1988	NI	éclairage normal du laboratoire, 540-1 080 lux
ASTM, 1990	90-100% dans l'eau t/d	NI
NCASI, 1991, 1992	NI	éclairage normal du laboratoire, à fluorescence
USEPA (Pac. 91)	NI	NI
USEPA (Pac. 92)	NI	éclairage normal du laboratoire, 540-1 100 lux
Kobayashi, 1971, 1984	NI	NI
S. Calif. Project	non contrôlé	NI
Nacci et coll., 1986	NI	NI
Cherr et coll., 1987	NI	NI
BML, 1991	NI	NI
ERCEES, 1990	NI	NI
MECAS, 1990	NI	NI
NWAS, 1990	NI	éclairage normal du laboratoire; aucune photopériode requise

7. Concentration des ions hydrogène au début de l'essai

Document	pH de l'eau d'essai, à moins d'indication contraire, et ajustement
Beak, 1988	NI
EVS, 1989	pH de l'échantillon ajusté à 7,5 au besoin; NI pour le pH de l'eau d'essai
MECB, 1990	NI
GITA, 1991	NI
Dinnel et coll., 1987	pH ajusté au besoin; niveaux non mentionnés
USEPA, 1988	NI
ASTM, 1990	7,8-8,1 pour l'oursin violet du Pacifique et « analogue » pour les autres espèces; pH de l'eau t/d ajusté
NCASI, 1991, 1992	NI
USEPA (Pac. 91)	8,1 ± 0,1 pour l'eau t/d
USEPA (Pac. 92)	NI
Kobayashi, 1971, 1984	NI
S. Calif. Project	non contrôlé; pH moyen de 7,8-7,9 dans certains essais
Nacci et coll., 1986	NI
Cherr et coll., 1987	NI
BML, 1991	8,0; pH de l'échantillon et de l'eau t/d ajusté au besoin; stabilisation du pH
ERCEES, 1990	NI
MECAS, 1990	8,0 ± 0,2; pH des solutions d'essai ajusté au besoin
NWAS, 1990	8,0

8. Volume d'eau d'essai, récipients et nombre de répétitions

Document	Volume (mL)	Récipient	Répétitions (mL)
Beak, 1988	5	flacons à scintillation de 20 mL, jetables	4
EVS, 1989	10	tubes à essai (16 × 150 mm) avec bouchon	3
MECB, 1990	2	tubes en verre borosilicaté, jetables	3
GITA, 1991	5	flacons à scintillation de 20 mL, jetables	3
Dinnel et coll., 1987	10	tubes à essai en verre borosilicaté (16 × 100 mm) jetables et non nettoyés	≥3
USEPA, 1988	5	flacons à scintillation de 20 mL, jetables	≥3 (habituellement 4)
ASTM, 1990	NI	flacons en verre de 15-22 mL ou autre	4 recommandées (habituellement ≥3)
NCASI, 1991, 1992	2	tubes à culture en verre borosilicaté (13 × 100 mm), jetables	4
USEPA (Pac. 91)	5	tubes en verre borosilicaté (16 × 100 mm)	3
USEPA (Pac. 92)	5	tubes à essai en verre (16 × 100/125 mm), jetables	≥3
Kobayashi, 1971	NI	rince-doigts en verre de 5 cm de diamètre, 3 cm de profondeur	NI
Kobayashi, 1984	NI	rince-doigts en verre, rempli du milieu d'essai	NI
S. Calif. Project	50 (sperme)	gobelet en polypropylène	NI
	900 (œufs)	bécher de 1 L	NI
Nacci et coll., 1986	10	flacons en verre	NI
Cherr et coll., 1987	2	tubes à culture borosilicatés (13 × 100 mm)	NI
BML, 1991	2	NI	3
ERCEES, 1990	10	flacons à scintillation de 20 mL	4
MECAS, 1990	5	flacons à scintillation de 25 mL	≥3
NWAS, 1990	10	tubes à culture borosilicatés (18 × 150 mm)	4

9. Exposition du sperme, exposition du sperme et des œufs, témoins

Document	Exposition du sperme	Exposition du sperme et des œufs	Témoins
Beak, 1988	60 min	60 min	4, eau t/d
EVS, 1989	OG : 30 min OP : 60 min	20 min 20 min	3, eau t/d; échantillons d'eau douce et témoins en double de la salinité préparés avec de l'eau distillée; concentrations identiques aux concentrations de l'échantillon
MECB, 1990	10 min	10 min	3, eau de mer
GITA, 1991	60 min	20 min	3, eau t/d
Dinnel et coll., 1987	60 min	20 min	≥3, eau t/d
USEPA, 1988	60 min	20 min	≥3, eau t/d (habituellement 4)
ASTM, 1990	60 min	20 min	eau t/d; témoin du solvant, le cas échéant
NCASI, 1991, 1992	10 min	10 min	4, eau t/d
USEPA (Pac. 91)	20 et 60 min	20 et 60 min	divers témoins pour évaluer les différentes méthodes à expérimenter dans cette étude comparative
USEPA (Pac. 92)	60 min	20 min	≥3, eau t/d; œufs non fécondés dans l'eau t/d et à concentration élevée; témoins facultatifs de l'eau de mer et de l'eau réceptrice; témoins de la salinité lorsque la salinité des échantillons est de <30 g/kg ou de >34 g/kg
Kobayashi, 1971	aucune exposition; spermatozoïdes et œufs soumis ensemble à une exposition de 3 min pour mesurer le taux de fécondation		oui; on suppose qu'il s'agit d'eau t/d
Kobayashi, 1984	NI; on suppose que les spermatozoïdes et les œufs sont soumis ensemble à une exposition de 3 min pour mesurer le taux de fécondation; dans le cas de gamètes « âgés », exposition préalable des spermatozoïdes à la solution d'essai pendant 5 min et exposition préalable des œufs pendant plusieurs heures		NI
S. Calif. Project	15 min	exposition préalable des œufs pendant 30 min, puis 15 min avec les spermatozoïdes	4, eau de mer et témoins de la salinité correspondant aux concentrations de l'effluent

Document	Exposition du sperme	Exposition du sperme et des œufs	Témoins
Nacci et coll., 1986	60 min	20 min	NI
Cherr et coll., 1987	10 min	10 min	oui; détails non mentionnés
BML, 1991	10 min	10 min	NI; on suppose qu'il s'agit d'eau t/d
ERCEES, 1990	60 min	20 min	NI; on suppose qu'il s'agit de 4 témoins d'eau t/d
MECAS, 1990	NI	NI	≥3, eau de mer
NWAS, 1990	60 min	20 min	4, eau t/d

10. Stimulation du frai et collecte des gamètes

Document	Stimulus	Collecte
Beak, 1988	0,5 mL de KCl 0,5 M	5 mm d'eau de mer dans des boîtes de Petri
EVS, 1989	0,5 mL de KCl 0,5 M (2 ^e injection au besoin)	eau t/d dans un bécher de 150 mL
MECB, 1990	OG : 1,0 mL de KCl 0,5 M	comme ci-dessus
	OP : 0,5 mL de KCl 0,5 M	eau de mer à 10 °C dans un bécher de 250 mL
GITA, 1991	0,5 mL de KCl 0,5 M	5 mm d'eau de mer dans des boîtes de Petri
Dinnel et coll., 1987	OG : 1,0 mL de KCl 0,5 M	eau de mer dans un bécher de 100 mL
	OP : 0,5 mL de KCl 0,5 M	
USEPA, 1988	12 V c.c. pendant 30 s	bol contenant peu d'eau t/d et seringue
ASTM, 1990	pour la plupart des espèces, 0,5-1,0 mL de KCl 0,5 M et 2 ^e injection après 10 min si le frai ne se produit pas; pour <i>A. punctulata</i> , 12 V c.c.	eau de mer dans un petit bécher
NCASI, 1991, 1992	OG : 1,0 mL de KCl 0,5 M	collecte avec une pipette et transfert dans des tubes à 12 °C; eau t/d dans un bécher de 50 mL (OG : bécher de 100 mL)
	OP : 0,5 mL de KCl 0,5 M	
USEPA (Pac. 91)	0,5-1,0 mL de KCl 0,5 M et 2 ^e injection au besoin	eau t/d dans un bécher de 100-mL
USEPA (Pac. 92)	0,5 mL de KCl 0,5 M et 2 ^e injection au besoin	pour les œufs, eau t/d dans un bécher de 100 mL; sperme prélevé à sec
Kobayashi, 1971	injection de KCl pour les ♀	gonades enlevées; sperme prélevé à sec exposé à l'eau de mer
Kobayashi, 1984	« méthode du KCl »	NI
S. Calif. Project	0,5 mL de KCl 0,5 M	pour les œufs, eau de mer, dans un bécher de 100 mL; sperme prélevé à sec avec une pipette et transféré dans des tubes à <5 °C
Nacci et coll., 1986	électricité	NI milieu humide (♂), prélèvement avec une pipette et dépôt dans des flacons sur de la glace
Cherr et coll., 1987	0,5 mL de KCl 0,5 M	eau de mer dans un bécher de 50 mL

Document	Stimulus	Collecte
BML, 1991	0,5-1,0 mL de KCl 0,5 M	agitation et transfert dans un rince-doigts avec de l'eau de mer (♀)
ERCEES, 1990	0,5 mL de KCl 0,5 M	dans un petit bécher, collecte à sec du sperme et dans l'eau pour les œufs
MECAS, 1990	0,5 mL de KCl 0,5 M et 2 ^e injection après 5 min au besoin	pour les œufs, transfert dans un bécher de 100 mL contenant 20 mL d'eau; collecte à sec du sperme avec une seringue et transfert dans un flacon sur de la glace
NWAS, 1990	OG : 1,0 mL de KCl 0,5 M OP : 0,5 mL de KCl 0,5 M	dans un bécher vide de 100 mL, collecte des œufs dans l'eau t/d froide; collecte à sec du sperme avec une pipette et transfert dans un tube à essai refroidi

11. Conservation des gamètes

Document	Conditions et restrictions
Beak, 1988	sperme composite provenant de plusieurs mâles
EVS, 1989	OG : conservation du sperme sur de la glace; œufs rincés 3 fois; mélange des gamètes ♂ et ♀
MECB, 1990	sperme composite de ≥ 2 mâles; utilisé dans ≤ 4 h; entreposage des œufs pendant ≤ 24 h
GITA, 1991	sperme composite, conservé sur de la glace et utilisé dans ≤ 20 min; œufs provenant de 4 spécimens
Dinnel et coll., 1987	l'activation de sperme pendant $\leq 1,5$ h n'a pas eu d'effet sur l'essai; œufs rincés 3 fois; combinaison facultative
USEPA, 1988	sperme utilisé dans < 1 h, conservé sur de la glace; œufs conservés pendant plusieurs heures à la température ambiante
ASTM, 1990	sperme conservé pendant plusieurs heures dans l'eau de mer fraîche; se conserve « au sec » et au froid de nombreuses heures; œufs rincés 2-3 fois; sperme conservé dans des récipients distincts, utiliser le test des cubes pour l'essai et la combinaison
NCASI, 1991, 1992	sperme utilisé dans ≤ 1 h; œufs, normalement dans ≤ 2 h; conservation à 12 °C
USEPA (Pac. 91)	collecte pendant ≤ 30 min; œufs rincés 2 fois; combinaison du sperme
USEPA (Pac. 92)	collecte pendant ≤ 30 min; œufs rincés 2 fois; conservation dans l'eau à concentration normalisée; conservation du sperme dans des flacons distincts sur de la glace et utilisation dans ≤ 4 h
Kobayashi, 1971	utilisation dans ≤ 1 h
Kobayashi, 1984	utilisation des gamètes dans ≤ 1 h; œufs rincés plusieurs fois
S. Calif. Project	sperme prélevé « à sec » gardé à < 5 °C; mélange des œufs de six ♀; 2 rinçages
Nacci et coll., 1986	NI
Cherr et coll., 1987	conservation des gamètes sur de la glace pendant ≤ 2 h
BML, 1991	œufs et sperme (prélevé « à sec ») conservés dans des flacons sur de la glace; œufs rincés 2 fois
ERCEES, 1990	combinaison du sperme et combinaison des œufs
MECAS, 1990	sperme prélevé « à sec » transféré dans des flacons et conservé sur de la glace; œufs rincés 2 fois; conservation dans l'obscurité à 12 °C
NWAS, 1990	conservation du sperme prélevé « à sec » dans des tubes réfrigérés; œufs rincés 2 fois et utilisation à l'état frais

12. Nombre de gamètes par récipient d'essai et rapport spermatozoïdes:œufs

Document	Spermatozoïdes par récipient	Œufs par récipient	Rapport spermatozoïdes:œufs
Beak, 1988	7 ou 5 millions?	2 000	2 500:1 ou 3 500:1?
EVS, 1989	OG : 4 millions OP : 2,4 millions	2 000 2 000	2 000:1 1 200:1
MECB, 1990	NI	500	NI
GITA, 1991	~5 millions	2 000	~2 500:1
Dinnel et coll., 1987	quantités variables	2 000	déterminer le rapport approprié; habituellement 200:1 pour <i>S. purpuratus</i> , 1 000:1 pour l'oursin rouge, 2 000:1 pour l'oursin vert, 1 200:1 pour <i>D. excentricus</i>
USEPA, 1988	5 millions	2 000	2 500:1
ASTM, 1990	quantité empirique pour obtenir un taux de fécondation de 70-90 %	200/mL de solution d'essai	habituellement 200:1 pour <i>S. purpuratus</i> , 1 200:1 pour <i>D. excentricus</i> et 2 000-2 500:1 pour les autres espèces
NCASI, 1991, 1992	OP : 20 000-60 000 OG : quantité empirique	500 500	40:1-120:1 déterminer le rapport approprié
USEPA (Pac. 91)	quantités variables	1 120?	différents rapports pour comparer différentes méthodes
USEPA (Pac. 92)	560 000	1 120	500:1 (rapport fixe)
Kobayashi, 1971	NI	NI	NI
Kobayashi, 1984	NI	NI	NI
S. Calif. Project	NI (1,2 mL de préparation étalon)	31 500	NI
Nacci et coll., 1986	0,1 million	1 000	100:1 (1 000:1, selon les auteurs)
Cherr et coll., 1987	0,5 million	500	1 000:1
BML, 1991	NI (0,1 mL de sperme « sec »)	NI (0,1 mL)	1 000:1
ERCEES, 1990	quantité empirique	2 000	déterminer le rapport approprié
MECAS, 1990	1 million?	quantité empirique	déterminer le rapport approprié pour obtenir un taux de fécondation de 70-90 %
NWAS, 1990	quantité empirique	2000	déterminer le rapport approprié pour obtenir un taux de fécondation de 70-90 %; habituellement, rapports de 200-2 000:1

13. Correction des résultats en fonction du taux de fécondation chez les témoins*

Document	Méthode d'ajustement
Beak, 1988	formule d'Abbott
EVS, 1989	formule d'Abbott
MECB, 1990	formule d'Abbott
GITA, 1991	formule d'Abbott** : $A = (O - T) \times (100)/(100 - T)$
Dinnel et coll., 1987	formule d'Abbott
USEPA, 1988	formule d'Abbott
ASTM, 1990	« taux de fécondation ajusté » : $AF = 100 \times OF/TF$ ** [les symboles ont changé, mais cette formule donne le même résultat que la formule d'Abbott, calculée cette fois pour la fécondation]
NCASI, 1991, 1992	NI
USEPA (Pac. 91)	NI
USEPA (Pac. 92)	comme dans USEPA (1988)
Kobayashi, 1971	NI
Kobayashi, 1984	NI
S. Calif. Project	la CI_{50} n'est pas mentionnée comme étant une statistique à évaluer
Nacci et coll., 1986	NI
Cherr et coll., 1987	« normalisée » pour les taux de fécondation chez les témoins; méthode non indiquée
BML, 1991	NI
ERCEES, 1990	NI
MECAS, 1990	NI
NWAS, 1990	formule d'Abbott

* Les méthodes d'ajustement susmentionnées ne sont pas utilisées pour évaluer la CSEO/CMEO. Pour ces calculs, on utilise les valeurs non modifiées (brutes) du taux de fécondation. Les méthodes d'ajustement susmentionnées donnent les équivalents numériques du pourcentage de réduction de la fécondation, calculé dans la première édition du présent document comme résultat préliminaire pour l'estimation d'une CI_p . Dans cette deuxième édition, il n'est plus nécessaire de corriger le taux de fécondation chez les témoins, étant donné que les modèles de régression non linéaire contiennent explicitement une valeur à l'origine/asymptotique pour tenir compte directement de la performance chez les témoins. Nota : Pour tenir compte des effets chez les témoins, les données témoins doivent faire partie de l'ensemble de données analysé.

** A = taux ajusté d'œufs non fécondés, pour exposition dans un récipient d'essai donné
 O = taux observé d'œufs non fécondés, pour exposition dans un récipient d'essai donné
 T = taux témoin d'œufs non fécondés dans l'eau témoin/de dilution
 AF = taux ajusté d'œufs **fécondés** dans un récipient d'essai donné
 OF = taux observé d'œufs **fécondés** dans un récipient d'essai donné
 TF = taux témoin d'œufs **fécondés** dans l'eau témoin/de dilution

14. Exigences concernant la validité de l'essai

Document	Taux de fécondation chez les témoins (%)	Autres exigences
Beak, 1988	NI	
EVS, 1989	NI	
MECB, 1990	NI	
GITA, 1991	NI	
Dinnel et coll., 1987	≥50	
USEPA, 1988	≥70 (un taux de >90 pourrait masquer la toxicité)	
ASTM, 1990	≥50; taux souhaitable : 70-90; taux idéal 80-95	
NCASI, 1991, 1992	taux acceptable : 50-100; taux préférable : 50-90	
USEPA (Pac. 91)	taux souhaitable : 80-95	
USEPA (Pac. 92)	taux de fécondation ≥50 chez les témoins; la concentration des spermatozoïdes ne devrait pas être de >2 fois supérieure ou inférieure à celle de la concentration d'essai; essentiellement, fécondation nulle dans les témoins contenant uniquement des œufs (eau t/d et effluent)	
Kobayashi, 1971	NI	
Kobayashi, 1984	prétest : ≥85 (« gamètes âgés » : ≥91)	la membrane doit se soulever dans les 3 min qui suivent la fécondation
S. Calif. Project	NI	
Nacci et coll., 1986	≥60m, ≤90	
Cherr et coll., 1987	NI	
BML, 1991	NI	
ERCEES, 1990	≥70, ≤90	courbe dose-effet positive et logique; l'essai a satisfait aux exigences physicochimiques
MECAS, 1990	NI	
NWAS, 1990	≥70, ≤90	

15. Toxique de référence

Document	Substance chimique	Exigé?	Type d'essai ou paramètre*
Beak ,1988	NI		
EVS, 1989	dodécyl sulfate de sodium	oui	dans les essais de répétition, 5 concentrations de 1,0-10 mg/L
MECB, 1990	NI		
GITA, 1991	chlorure de cadmium	non	
Dinnel et coll., 1987	argent	non	
USEPA, 1988	sulfate de cuivre	oui	pour chaque lot de gamètes
ASTM, 1990	NI	non	« pourrait mesurer la sensibilité d'un frai »
NCASI, 1991, 1992	NI		
USEPA (Pac. 91)	cuivre	non?	
USEPA (Pac. 92)	cuivre, dodécyl sulfate de sodium ou autre toxique	oui	dans chaque série d'essais
Kobayashi, 1971	NI		
Kobayashi, 1984	NI		
S. Calif. Project	NI		
Nacci et coll., 1986	NI		
Cherr et coll., 1987	azoture de sodium	non	
BML, 1991	NI		
ERCEES, 1990	NI		
MECAS, 1990	NI		
NWAS, 1990	azoture de sodium	oui	en parallèle avec l'essai principal

* Sauf indication contraire, il s'agit d'un essai type dont les paramètres sont utilisés dans l'essai proprement dit et comprenant une estimation de la CI_p et de la CSEO/CMEO.

Bibliographie – Articles et documents supplémentaires se rapportant directement à l'essai canadien sur la fécondation chez les échinides

La présente liste pourrait être utile aux laboratoires qui désirent consulter une plus vaste gamme d'ouvrages relatifs aux essais avec des échinides. Beaucoup de ces documents contiennent des données sur les concentrations de divers polluants qui sont toxiques pour les gamètes d'échinides, ou comparent les résultats sur d'autres stades de développement ou d'autres organismes. Certaines notes ont été ajoutées entre crochets.

- Adams, J.A., « Effect of PCB (Aroclor 1254) on Early Development and Mortality in *Arbacia* Eggs », *Water Air Soil Pollut.*, 20(1):1-6 (1983).
- Allen, H., « Effects of Petroleum Fractions on the Early Development of a Sea Urchin », *Mar. Pollut. Bull.*, 2:138-140 [développement embryonnaire plus sensible que la fécondation] (1971).
- ASTM (American Society for Testing and Materials), *Proposed Standard EXXX for Conducting Static Acute Toxicity Tests with Echinoid Embryos*, version provisoire n° 1, ASTM Subcommittee of E-47.01 on Aquatic Toxicology, Philadelphie (PA) [prés. : P.A. Dinnel, Ph. D., Fisheries Res. Inst., Univ. Washington, Seattle (WA)] [l'essai de 48-96 h porte sur le développement embryonnaire] (1991).
- ASZ (American Society of Zoologists), « Developmental Biology of the Echinoderms. A Symposium », *Amer. Zool.*, 15 (3):485-775 (1975).
- Bay, S.M., P.S. Oshida et K.D. Jenkins, « A Simple New Bioassay Based on Echinochrome Synthesis by Larval Sea Urchins », *Mar. Environ. Res.*, 8:29-39 (1982).
- Bougis, P., « Effet du cuivre sur la croissance du plutéus d'Oursin (*Paracentrotus lividus*) », *C.R. Acad. Sci. Paris*, 260:2929–2931 [croissance des embryons] (1965).
- Bougis, P., M.C. Corre et M. Étienne, « Sea Urchin Larvae as a Tool for Assessment of the Quality of Sea-water », *Ann. Inst. Oceanogr. (Paris)*, 55:21-26 (1979).
- Bresch, H., R. Speilhoff, V. Mohr et H. Barkemeyer, « Use of Sea Urchin Egg for Quick Screen Testing of the Biological Activity of Substances. I. Influence of Fractions of a Tobacco Smoke Condensate on Early Development », *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 141:747-752 (1972).
- Canevari, G.P., et G.P. Lindblom, « Some Dissenting Remarks on Deleterious Effects of Corexit 9527 on Fertilization and Development », *Mar. Pollut. Bull.*, 7 (7):127-128 [fait suite à un article de Lønning et Hagström, 1976, et offre une critique] (1976).
- Carr, R.S., et M. Nipper (éd.), *Porewater Toxicity Testing: Biological, Chemical and Ecological Considerations*, Proceedings from the Workshop on Sediment Porewater Toxicity Testing: Biological, Chemical, and Ecological Considerations, Society of Environmental Toxicology and Chemistry Press, Pensacola (FL) (2003).
- Castagna, A., F. Sinatra, M. Scalia et V. Capodicasa, « Observations of the Effect of Zinc on the Gametes and Various Development Phases of *Arbacia lixula* », *Mar. Biol.*, 64:285-289 [motilité des spermatozoïdes réduite en 96 h] (1981).
- Ceas, M.P., « Effects of 3,4-Benzopyrene on Sea Urchin Egg Development », *Acta Embryol Exp.*, 3:267-272 (1974).
- de Angelis, E., et G.G. Giordano, « Sea Urchin Egg Development Under the Action of Benzo-a-pyrene and 7-12-Dimethylbenz-a-anthracene », *Cancer Res.*, 34:1275-1280 (1974).

- den Besten, P.J., H.J. Herwig, D.I. Zandee et P.A. Voogt, « Effects of Cadmium and PCBs on Reproduction of the Sea Star *Asterias rubens*: Aberrations in the Early Development », *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 18:173-180 (1989).
- Dinnel, P.A., *Adaption of the Sperm/Fertilization Bioassay Protocol to Hawaiian Sea Urchin Species*, rapport définitif préparé pour le State of Hawaii Dept. of Health, Marine Biological Consultants of Washington, rapport MBCW-8801 (1988).
- _____, *Annotated Bibliography of Bioassays Related to Sediment Toxicity Testing in Washington State*, rapport définitif préparé pour l'U.S. Army Corps of Engineers, Seattle (WA), School of Fisheries, Univ. Washington, rapport FRI-UW-9017 (1990).
- Dinnel, P.A., et R.M. Kocan, *Puget Sound Estuary Program Sediment Bioassay Comparison Test: Results of the Sand Dollar (Dendraster excentricus) Embryo Bioassays*, rapport définitif préparé pour le Battelle Laboratories et l'Environmental Protection Agency, Seattle (WA), Marine Biological Consultants of Washington, rapport MBCW-8802 (1988).
- Dinnel, P.A., S.C. Crumley et Q.J. Stober, *Sand dollar (Dendraster excentricus) Sperm and Embryo Bioassay of Puget Sound Receiving Water Samples*, rapport définitif préparé pour le Washington State Shellfish Lab., Brinnon (WA), School of Fisheries, Univ. Washington, rapport FRI-UW-7912 [essais parallèles menés dans deux laboratoires avec du sperme et des embryons d'oursins plats et des larves d'huîtres] (1979).
- Dinnel, P.A., Q.J. Stober et D.H. DiJulio, « Sea Urchin Sperm Bioassay for Sewage and Chlorinated Seawater and its Relation to Fish Bioassays », *Mar. Environ. Res.*, 5:29-39 (1981).
- Dinnel, P.A., Q.J. Stober, J.M. Link, M.W. Letourneau, W.E. Roberts, S.P. Felton et R.E. Nakatani, *Methodology and Validation of a Sperm Cell Toxicity Test for Testing Toxic Substances in Marine Waters*, School of Fisheries, Univ. Washington, rapport FRI-UW-8306 (1983).
- Drouin, G., J.H. Himmelman et P. Béland, « Impact of Tidal Salinity Fluctuations on Echinoderm and Mollusc Populations », *Can. J. Zool.*, 63:1377-1387 (1985).
- Ebert, T.E., « Growth and Mortality of Post-larval Echinoids », *Amer. Zool.*, 15(3):755-775 [fait partie d'un symposium] (1975).
- Epel, D., « The Program of and Mechanisms of Fertilization in the Echinoderm Egg », *Mer. Zool.*, 15:507-522 (1975).
- EVS (E.V.S. Consultants), *An Evaluation of the Sensitivity of Microassays Relative to Trout and Daphnid Acute Lethality Tests*, E.V.S. Consultants, North Vancouver (C.-B.), rapport préparé pour le Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) [brefs commentaires concernant l'essai sur le sperme relativement à d'autres essais rapides] (1989).
- Ferrari, L., R.J. Lombardo, P. del Giorgio, M.C. Tortorelli et D.A. Hernandez, « Effects of Formulated Ethyl Parathion on Fertilization of the Sea Urchin *Pseudechinus magellanicus* (Phillippi) », *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 42:367-374 (1989).
- Guidice, G., *The Sea Urchin Embryo. A Developmental Biological System*, Springer-Verlag, Berlin (1986).
- Hagström, B.E., et S. Lønning, « The Sea Urchin Egg as a Testing Object in Toxicology », *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 32(supp.1):1-49 (1973).
- _____, « Deleterious Effects of Corexit 9527 on Fertilization and Development », *Mar. Pollut. Bull.*, 8:136-138 (1977).
- Hernández, D.A., R.J. Lombardo, L. Ferrari et M.C. Tortorelli, « Toxicity of Ethyl-parathion and Carbaryl on Early Development of Sea Urchin », *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 45:734-741 (1990).
- Heslinga, G.A., « Effects of Copper on the Coral-reef Echinoid *Echinometra mathaei* », *Mar. Biol.*, 35:155-160 [gamètes, embryons et adultes exposés] (1976).

- Himmelman, J.H., « Reproductive Cycle of *Strongylocentrotus droebachiensis* », *Can. J. Zool.*, 56:1828-1836 (1978).
- Himmelman, J.H., Y. Lavergne, F. Axelsen, A. Cardinal et E. Bourget, « Sea Urchins in the Saint Lawrence Estuary: Their Abundance, Size, Structure and Suitability for Commercial Exploitation », *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, 40:474-486 (1983).
- Hinegardner, R.T., « Morphology and Genetics of Sea Urchin Development », *Amer.Zool.*, 15(3):679-690 (1975).
- Hinegardner, R.T., et M.M.R. Tuzzi, « Laboratory Culture of the Sea Urchin *Lytechinus pictus* », p. 291-308, dans *NRC, 1981, Laboratory Animal Management, Marine Invertebrates*, Committee on Marine Invertebrates, Inst. Lab. Animal Resources, U.S. National Research Council, National Academy Press, Washington (DC) (1981).
- Hose, J.E., « Potential Uses of Sea Urchin Embryos for Identifying Toxic Chemicals: Description of a Bioassay Incorporating Cytologic, Cytogenetic and Embryologic Endpoints », *J. Appl. Toxicol.*, 5:245-254 [essai de 48 h sur la croissance] (1985).
- Hose, J.E., et H.W. Puffer, « Cytologic and Cytogenetic Anomalies Induced in Purple Sea Urchin Embryos (*Strongylocentrotus purpuratus* S.) by Parental Exposure to Benzo(a) pyrene », *Mar. Biol Lett.*, 4:87-95 (1983).
- Hose, J.E., H.W. Puffer, P.S. Oshida et S.M. Bay, « Development and Cytogenetic Abnormalities Induced in the Purple Sea Urchin by Environmental Levels of Benzo(a) pyrene », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 12:319-325 (1983).
- Jackim, E., et D. Nacci, « A Rapid Aquatic Toxicity Assay Utilizing Labeled Thymidine Incorporation in Sea Urchin Embryos », *Environ. Toxicol. Chem.*, 3:631-636 (1984).
- _____, « Improved Sea DNA-based Embryo Growth Toxicity Test », *Environ. Toxicol. Chem.*, 5:561-565 (1986).
- Kinae, N., T. Hashizume, T. Makita, I. Tomita et I. Kimura, « Kraft Pulp Mill Effluent and Sediment Can Retard Development and Lyse Sea Urchin Eggs », *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 27:616-623 (1981).
- Kobayashi, N., « Bioassay Data for Marine Pollution Bioassay Using Sea Urchin Eggs », *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 19 4(6):439-444 [fertilisation (3 min) réussie et croissance larvaire (12 à 36 h)] (1972).
- _____, « Studies on the Effects of Some Agents on Fertilized Sea Urchin Eggs, as a Part of the Bases for Marine Pollution Bioassay », *I. Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 21(2):109-114 (1973).
- _____, « Marine Pollution Bioassay by Sea Urchin Eggs, an Attempt to Enhance Accuracy », *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 21(5/6):377-391 (1974).
- _____, « Bioassay Data for Marine Pollution Using Sea Urchin Eggs, 1975 », *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 23(6):427-433 (1977).
- _____, « Preliminary Experiments with Sea Urchin *Pluteus* and Metamorphosis in Marine Pollution Bioassay », *Publ. Seto Mar. Bio. Lab.*, 24(1/3):9-21 [oursin plat plus sensible que l'oursin globuleux, plutéus encore plus sensible] (1977).
- _____, « Comparative Toxicity of Various Chemicals, Oil Extracts and Oil Dispersant Extracts to Canadian and Japanese Sea Urchin Eggs », *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 26(1/3):123-133 (1981).
- _____, « Marine Pollution Bioassay by Sea Urchin Eggs, An Attempt to Enhance Accuracy, II », *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 30(4/6):213-226 [comparaison de diverses combinaisons d'œufs ou de spermatozoïdes prétraités, qui donne des résultats intéressants] (1985).
- _____, « Marine Pollution Bioassay by Sea Urchin Eggs, an Attempt to Enhance Sensitivity », *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 34 (4-6):225-237 (1990).

- Kobayashi, N., H. Nogami et K. Doi, « Marine Pollution Bioassay by Using Sea Urchin Eggs in the Inland Sea of Japan (the Seto-Naikai) », *Publ. Seto Mar. Biol. Lab.*, 19(6):359-381 (1972).
- Lee, H.H., et C.H. Xu, « Effects of Metals on Sea Urchin Development: A Rapid Bioassay », *Mar. Pollut. Bull.*, 15:18-21 (1984).
- Long, E.R., et M.F. Buchman, « An Evaluation of the Performance of Five Types of Sediment Toxicity Tests », p. 603-607, dans *Oceans '89, An International Conference Addressing Methods for Understanding the Global Ocean. Vol. 2, Ocean Pollution*, du 18 au 21 septembre 1989, Seattle (WA), Marine Technol. Soc., Washington (DC), et Inst. Electrical and Electronics Engineers, Piscataway (NJ) [compare les résultats relatifs à *Strongylocentrotus purpuratus* avec ceux d'autres espèces marines] (1989).
- Long, E.R., et M.F. Buchman, *An Evaluation of Candidate Measures of Biological Effects for the National Status and Trends Program*, NOAA Tech. Mem. NOS OMA 45, National Oceanic and Atmospheric Administration, U.S. Dept. of Commerce, Seattle (WA) (1989).
- Lønning, S., « The Sea Urchin Egg as a Test Object in Oil Pollution Studies », *Procès-verbal de la réunion du Conseil international pour l'exploration de la mer*, 171:186-188 (1977).
- Lønning, S., et B.E. Hagström, « The Effects of Crude Oils and the Dispersant Corexit 8666 on Sea Urchin Gametes and Embryos », *Norw. J. Zool.*, 23:121-129 (1975).
- _____, « Deleterious Effects of Corexit 9527 on Fertilization and Development », *Mar. Pollut. Bull.*, 7 (7):124-127 [v. Canevari et Lindblom, 1976] (1976).
- Nacci, D., et E. Jackim, « Rapid Aquatic Toxicity Assay Using Incorporation of Tritiated-thymidine Into Sea Urchin, *Arbacia punctulata* Embryo: Evaluation of Toxicant Exposure Procedures », p. 382-394, dans *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium*, R.C. Bahneer et D.J. Hansen (dir.), ASTM STP No. 891, Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphie (PA) (1985).
- Nacci, D.E., R. Walsh et E. Jackim, *Guidance Manual for Conducting Sperm Cell Tests with the Sea Urchin, *Arbacia punctulata*, for Use in Testing Complex Effluents*, Contribution No. X105, Environ. Res. Lab., U.S. Environmental Protection Agency, Narragansett (RI) (1985).
- Nicol, J.A.C., W.H. Donahue, R.T. Wang et K. Winters, « Chemical Composition and Effects of Water Extracts of Petroleum on Eggs of the Sand Dollar *Melitta quinquesperforata* », *Mar. Biol.*, 40:309-316 (1977).
- Oshida, P.S., et T.K. Goochey, *A New Test for Measuring Seawater Toxicity*, South Calif. Coastal Water Res. Project Biennial Rept. (1980).
- Ozretic, B., et M. Krajnovic-Ozretic, « Morphological and Biochemical Evidence of the Toxic Effect of Pentachlorophenol on the Developing Embryos of the Sea Urchin », *Aquat. Toxicol.*, 7:255-263 (1985).
- Pagano, G., M. Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, G.G. Giordano, E. Ragucci et N.M. Trieff, « Comparative Toxicities of Benzene, Chlorobenzene and Dichlorobenzene to Sea Urchin Embryos and Sperm », *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 40:481-488 (1988).
- Pagano, G., M. Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, A. Mineo, E. Ragucci, G.G. Giordano, N. Kobayashi et N.M. Trieff, « Effects of Sodium Azide on Sea Urchin Embryos and Gametes », *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 8:363-376 (1988).
- Pagano, G., M. Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, E. Ragucci, G.G. Giordano et N.M. Trieff, « Comparative Toxicities of Chlorinated Biphenyls on Sea Urchin Egg Fertilisation and Embryogenesis », *Mar. Environ. Res.*, 17:240-244 (1985).

- Pagano, G., G. Corsale, A. Esposito, P.A. Dinnel et L.A. Romana, « Use of Sea Urchin Sperm and Embryo Bioassay Testing the Sublethal Toxicity of Realistic Pollutant Levels », p. 153-163, dans *Carcinogenic, Mutagenic, and Teratogenic Marine Pollutants; Impact on Human Health and the Environment* [publié pour le compte du bureau régional européen de l'Organisation mondiale de la santé et du Programme environnemental des Nations Unies] *Advances in Applied Biotechnology Series*, vol. 5, Gulf Publ. Co., Houston (TX) [aucun détail sur les méthodes] (1989).
- Pagano, G., Esposito, P.P. Bove, M. de Angelis, A. Rota, E. Vamvakinos et G.G. Giordano, « Arsenic-induced developmental defects and Mitotic Abnormalities in Sea-urchin Development », *Mutation Res.*, 104:351-354 [sperme préexposé] (1982).
- Pagano, G., A. Esposito et G.G. Giordano, « Fertilization and Larval Development in Sea Urchins Following Exposure of Gametes and Embryo to Cadmium », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 11:47-55 (1982).
- Pagano, G., A. Esposito, G.G. Giordano et B.E. Hagström, « Embryotoxic and Teratogenic Effects of Styrene Derivatives on Sea Urchin Development », *Scand. J. Work Environ. & Health*, 4 (suppl. 2):136-141 (1978).
- Pagano, G., A. Esposito, G.G. Giordano, E. Vamvakinos, I. Quinto, G. Bronzetti, C. Bauer, C. Corsi, R. Nieri et A. Ciajolo, « Genotoxicity and Teratogenicity of Diphenyl and Diphenyl Ether: A Study of Sea Urchins, Yeast, and *Salmonella typhimurium* », *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 3:377-393 (1983).
- Pastorok, R.A., et D.S. Becker, « Comparative Sensitivity of Bioassays for Assessing Sediment Toxicity in Puget Sound », p. 431-436, dans *Oceans '89, An International Conference Addressing Methods for Understanding the Global Ocean. Vol. 2, Ocean pollution*, du 18 au 21 septembre 1989, Seattle (WA), Marine Technol. Soc., Washington (DC), et Inst. Electrical and Electronics Engineers, Piscataway (NJ) (1989).
- _____, « Comparative Sensitivity of Sediment Toxicity Bioassays at Three Superfund Sites in Puget Sound », p. 123-139, dans *Aquatic Toxicology and Risk Assessment: thirteenth volume*, W.G. Landis et W.H. van der Schalie (dir.), ASTM STP No. 1096, Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphie (PA) [*Dendraster*] (1990).
- Pavillon, J.F., « Sea Urchin Eggs and Larvae: Excellent Biological Indicators », p. 821-825, dans *Echinoderm Biology, Proc. Sixth Internat. Echinoderm Conf.*, du 23 au 28 août 1987, Victoria (C.-B.), R.D. Burke, P.V. Mladenov, P. Lambert et R.L. Parsley (dir.), A.A. Balkema, Rotterdam [explications et analyses utiles pour l'essai embryolaire] (1988).
- Pearce, J.S., D.J. Eernisse, V.B. Pearce et K.A. Beauchamp, « Photoperiodic Regulation of Gametogenesis in Sea Stars, with Evidence for an Annual Calendar Independent of Fixed Daylength », *Amer. Zool.*, 26:417-431 [technique de maturation des oursins hors saison] (1986).
- Pearse, V.B., et K.K. Davis, « Photoperiodic Regulation of Gametogenesis and Growth in the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus* », *J. Exp. Zool.*, 27:107-118 [technique de maturation des oursins hors saison] (1986).
- Percy, J.A., « Thermal Adaption in the Boreo-arctic Echinoid, *Strongylocentrotus droebachiensis* (O.F. Müller, 1776). I. Seasonal Acclimatization of Respiration. II. Seasonal Acclimatization and Urchin Activity. IV. Acclimation in the Laboratory », *Physiol. Zoo.*, 45:277-289; 46:129-138; 47:163-171 (1972, 1973, 1974).
- Puget Sound Estuary Program, *Recommended Protocols for Conducting Laboratory Bioassays on Puget Sound Sediments*, rapport définitif présenté à l'U.S. Environmental Protection Agency, Seattle (WA) [essai sur la croissance jusqu'au stade pluteïque] (1991).

- Raymond, B.G., *Behaviour and Growth of the Early Life History Stages of Strongylocentrotus droebachiensis*, mémoire de maîtrise, Département de biologie, Université Dalhousie, Halifax (N.-É.) (1985).
- Roller, R.A., et W.B. Stickle, « Effects of Salinity on Larval Tolerance and Early Developmental Rates of Four Species of Echinoderms », *Can. J. Zool.*, 63:1531-1538 (1985).
- Runnström, J., et B. Hagström, « The Effect of Some Oxidizing Agents Upon Fertilization and Ensuing Development of the Sea Urchin Egg », *Exper. Cell Res.*, 7:327-344 (1955).
- Schilling, F.M., et D.T. Manahan, « Energetics of Early Development for the Sea Urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *Lytechinus pictus* and the Crustacean *Artemia* sp. », *Mar. Biol.*, 106:119-127 (1990).
- Stebbing, A.R.D., B. Åkesson, A. Calabrese, J.H. Gentile et R. Lloyd, « The Role of Bioassays in Marine Pollution Monitoring. Bioassay Panel Report », *Procès-verbal de la réunion du Conseil international pour l'exploration de la mer*, 179:322-332 [bonne liste et revue] (1980).
- Strathmann, R.R., « Larval Feeding in Echinoderms », *Amer. Zool.*, 15(3):717-730 (1975).
- _____, « General Procedures », ch. 1, p. 3-43, dans *Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast. Data and Methods for the Study of Eggs, Embryos, and Larvae*, M.F. Strathmann (dir.), Univ. of Washington Press, Seattle (WA) (1987).
- Timourian, H., « The Effect of Zinc on Sea-Urchin Morphogenesis », *J. Exp. Zool.*, 169:121-131 (1968).
- Timourian, H., C.E. Hubert et R.N. Stuart, « Fertilization in the Sea-urchin as a Function of Sperm-to-Egg Ratio », *J. Reprod. Fert.*, 29:381-385 (1972).
- Trieff, N.M., M. Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, E. Ragucci, G.G. Giordano, S.V.N. Ramanujam, D.R. Livingstone et G. Pagano, « Aroclor 1254 Toxicity in Sea Urchin Embryos and Gametes », *Exp. Oncol.*, 7:57-64 (1988).
- Vaschenko, M.A., « Effects of Oil Pollution on the Development of Sex Cells in Sea Urchins », *Helgoländer Meeresunters.*, 33:297-330 (1980).
- _____, « The Effect of Water Soluble Hydrocarbon Fraction of Diesel Fuel on the Development of Gametes and Quality of Offspring of the Sea Urchin *Strongylocentrotus nudus* », *Soviet J. Mar. Biol.* [traduction de *Biologiya Morya* (URSS)], 6:236-242. [exposition d'adultes, évaluation du développement embryonnaire avec ou sans exposition additionnelle] (1980).
- Yamaguchi, M., et S. Kinoshita, « Inhibition of the Sulfated Polysaccharide Synthesis in Thiocyanate-treated Embryos of the Sea Urchin, *Clypeaster japonicus* », *Zool. Sci.*, 3:719-721 (1986).
- Young, L.G., et I. Nelson, « The Effects of Heavy Metal Ions On the Motility of Sea Urchin Spermatozoa », *Biol. Bull.*, 147:236-246 (1974).

Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques*

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

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

* Modifié d'après Rocchini et coll. (1982)

** On peut choisir une série de concentrations successives (au moins 7; nombre recommandé : ≥ 10) dans une même colonne. Les points médians entre les concentrations de la colonne (\times) se trouvent dans la colonne ($2\times + 1$). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées en pourcentage du volume ou du poids, en mg/L ou en $\mu\text{g/L}$. Au besoin, on pourrait les multiplier ou les diviser par n'importe quelle puissance de 10. On peut utiliser la colonne 2, dont les concentrations s'étalent sur deux ordres de grandeur, si le degré de toxicité est entaché de beaucoup d'incertitude. Il n'est pas recommandé d'utiliser des concentrations plus largement espacées. Pour les essais sur des effluents, les concentrations des colonnes à droite des colonnes 3 ou 4 donnent rarement lieu à des résultats plus précis. Les écarts moins grands des colonnes 4 à 7 pourraient être utiles dans les essais sur des substances chimiques qui ont un seuil d'effet abrupt.

www.ec.gc.ca

Pour des renseignements supplémentaires :

Environnement Canada

Informathèque

351, boulevard Saint-Joseph

Place Vincent-Massey, 8^e étage

Gatineau (Québec) K1A 0H3

Téléphone : 1-800-668-6767 (au Canada seulement) ou 819-997-2800

Télécopieur : 819-994-1412

ATS : 819-994-0736

Courriel : enviroinfo@ec.gc.ca

