

Méthode d'essai biologique : Essais de toxicité sur des grenouilles (*Lithobates pipiens*) selon leurs stades de développement aquatiques

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



Rapport
DGST 1/RM/62
Avril 2024



N° de cat. : En83-10/1-62-2024F-PDF
ISBN : 978-0-660-70722-8
EC23235

À moins d'avis contraire, il est interdit de reproduire le contenu de cette publication, en totalité ou en partie, à des fins de diffusion commerciale sans avoir obtenu au préalable la permission écrite de l'administrateur du droit d'auteur d'Environnement et Changement climatique Canada. Si vous souhaitez obtenir du gouvernement du Canada les droits de reproduction du contenu à des fins commerciales, veuillez demander l'affranchissement du droit d'auteur de la Couronne en communiquant avec :

Environnement et Changement climatique Canada
Centre de renseignements à la population
Édifice Place Vincent Massey
351 boul. Saint-Joseph
Gatineau (Québec) K1A 0H3
Ligne sans frais : 1-800-668-6767
Courriel : enviroinfo@ec.gc.ca

Photos page couverture : © Environnement et Changement climatique Canada

© Sa Majesté le Roi du chef du Canada, représenté par
le ministre de l'Environnement et du Changement climatique, 2024

Also available in English

Méthode d'essai biologique :
Essais de toxicité sur des grenouilles (*Lithobates pipiens*)
selon leurs stades de développement aquatiques

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

Rapport DGST 1/RM/62
Avril 2024

Commentaires

Adresser les commentaires sur la teneur du présent rapport à :

Leana Van der Vliet, gestionnaire
Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et Changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

Les demandes de renseignements généraux concernant la présente méthode peuvent être adressées à :
methods@ec.gc.ca

Avis de révision

Le présent document a été révisé par le personnel de la Direction générale des sciences et de la technologie d'Environnement et Changement climatique Canada, et sa publication a été autorisée. La mention d'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue ni une recommandation ni une approbation de leur emploi par Environnement et Changement climatique Canada. On peut se procurer d'autres produits de valeur analogue.

Résumé

Le présent document expose, conseils à l'appui, les modes opératoires et les conditions à suivre pour la préparation et la réalisation d'un essai biologique visant à mesurer la toxicité pour les organismes aquatiques en utilisant le stade larvaire de la grenouille léopard (*Lithobates pipiens* [anciennement *Rana pipiens*]).

Des méthodes sont proposées pour deux options d'essai :

- i) un essai de 14 jours pour évaluer la survie et la croissance des têtards, en utilisant des organismes d'essai récemment éclos (stade 25 de Gosner [SG 25]);
- ii) un essai de 42 jours pour évaluer la survie, la croissance et le développement des têtards, en utilisant des organismes d'essai qui viennent de commencer leur métamorphose (SG 28/29).

Appliquée dans des conditions avec renouvellement intermittent du milieu, chaque option d'essai emploie des échantillons d'eau contaminée ou une concentration unique ou des concentrations multiples de substance(s) ou de produit(s) chimique(s) ajoutés dans de l'eau de dilution propre. Les essais sont menés à une température moyenne de 23 ± 2 °C dans des aquariums en verre ou d'autres récipients appropriés, contenant au minimum 7 L de solution fille. On démarre les essais en plaçant 10 organismes d'essai dans chaque récipient d'essai (répétitions) contenant la solution fille ou de l'eau de dilution propre. Le stade de développement initial des organismes et le nombre de répétitions préparées pour chaque variante expérimentale dépendent de la méthode choisie et des objectifs particuliers de l'essai. Les observations relatives à la mortalité, à l'apparence ou au comportement anormaux et au stade de développement approximatif sont consignées quotidiennement. Au terme de chacune des options d'essai, la longueur totale individuelle, le poids humide, la biomasse, le stade de développement et le nombre de difformités sont mesurés ou calculés. Les mesures de la croissance sont corrigées en fonction des mesures initiales avant de calculer les paramètres statistiques. La moyenne des répétitions pour chaque variante expérimentale est calculée, et le pourcentage des concentrations entraînant un effet est estimé pour la mortalité et l'inhibition de la croissance (p. ex. CIp). Pour chaque variation expérimentale, les changements observés dans le développement sont calculés et comparés au témoin.

Pour la préparation et l'exécution des essais, on expose des conditions et des modes opératoires généraux ou universels. S'y ajoutent des conditions ou des modes opératoires propres à la destination de chacun des essais. La méthode d'essai biologique présentée ici convient à la mesure et à l'évaluation de la toxicité des substances chimiques ou des eaux contaminées. Le lecteur trouvera des instructions et des exigences concernant l'élevage de *L. pipiens* en laboratoire, les installations et l'approvisionnement en eau, la manipulation et l'entreposage des échantillons, la préparation des solutions, les conditions d'essai, les observations à faire, les paramètres d'essai et les méthodes de calcul connexes ainsi que l'utilisation de répétitions témoins positives ou d'un essai de toxicité de référence.

Avant-propos

Voici une série de **méthodes recommandées** pour évaluer et mesurer l'effet ou les effets toxiques subis par un organisme aquatique ou terrestre après exposition à des échantillons de substances ou de matières effectivement ou potentiellement toxiques, dans les conditions contrôlées et définies du laboratoire. Ces méthodes ont été évaluées par Environnement et Changement climatique Canada (anciennement Environnement Canada) et elles sont recommandées :

- pour les laboratoires d'écotoxicologie d'Environnement et Changement climatique Canada;
- pour les essais impartis par Environnement et Changement climatique Canada ou demandés à l'industrie ou à des organismes tiers;
- dans les cas où l'on ne possède pas d'instructions plus précises, comme celles que prévoient les règlements;
- en tant que fondement d'instructions très explicites, comme celles qui pourraient être exigées dans un protocole réglementaire ou dans une *méthode normalisée de référence*.

Les différents types d'essais choisis pour faire partie de cette collection ont été retenus parce qu'ils répondaient de façon acceptable aux besoins des programmes de protection et de gestion de l'environnement exécutés par Environnement et Changement climatique Canada. Les rapports qui leur sont consacrés visent à guider et à faciliter l'emploi de modes opératoires cohérents, adaptés et exhaustifs pour l'obtention de données sur la toxicité d'échantillons de substances ou de matières particulières, présentes dans le milieu ou destinées à y aboutir, à l'égard des formes de vie aquatique ou terrestre. Selon la méthode d'essai biologique choisie et la partie de l'environnement à laquelle on s'intéresse, ces substances ou matières pourraient englober des échantillons de substance ou de produit chimique, de sol, de sédiment ou de matière particulaire semblable, d'effluent, d'élutriat, de percolat ou d'eau réceptrice. Dans l'annexe A sont énumérés les méthodes d'essai biologique et les guides à l'appui qu'Environnement et Changement climatique Canada a publiés jusqu'à maintenant.

Les notions définies sous la rubrique « Terminologie » figurent une première fois en italiques dans le corps du texte.

Table des matières

Résumé	iii
Avant-propos	iv
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations, des symboles et des formules chimiques	ix
Terminologie	x
Remerciements	xx

Section 1

Introduction	1
1.1 Contexte	1
1.2 Identification, cycle de vie et aire de répartition	5
1.3 Sensibilité des grenouilles dans les essais de toxicité	8
1.3.1 Comparaison avec les poissons	8
1.3.2 Comparaison entre les différents stades de développement aquatiques	10
1.4 Utilisation des grenouilles dans les essais de toxicité	11

Section 2

Organismes d'essai	16
2.1 Espèces et stade de leur développement	16
2.2 Sources	18
2.3 Maintien et culture des embryons et des larves	23
2.3.1 Généralités	24
2.3.2 Équipement et appareillage	24
2.3.3 Éclairage	27
2.3.4 Température	28
2.3.5 Eau d'élevage	28
2.3.6 Alimentation des grenouilles	32
2.3.7 Manipulation des organismes et maintien des élevages	33
2.3.8 Critères de santé de l'organisme d'essai	33
2.3.9 Santé, quarantaine et maladies des embryons et des larves	34
2.4 Maintien et reproduction de grenouilles adultes	35
2.4.1 Généralités	35
2.4.2 Maintien de grenouilles adultes	35
2.4.3 Hibernation et reproduction	38
2.4.4 Santé, mise en quarantaine et maladies des grenouilles adultes	39

Section 3

Système expérimental	41
3.1 Équipement et appareillage	41
3.2 Éclairage	42
3.3 Essais préliminaires et essais définitifs	42
3.3.1 Essais préliminaires	42
3.3.2 Essais définitifs	43
3.4 Eau témoin/de dilution	43
3.5 Témoin positif	44

Section 4

Modes opératoires universels	45
4.1 Préparation des solutions d'essai	46
4.2 Début de l'essai	51
4.3 Conditions expérimentales et modes opératoires	53
4.3.1 Options d'essai	53
4.3.2 Type d'essai et renouvellement des solutions	53
4.3.3 Température d'essai et éclairage	54
4.3.4 Oxygène dissous et aération	54
4.3.5 pH	56
4.3.6 Alimentation des grenouilles	57
4.4 Observations et mesures pendant l'essai	58
4.5 Fin de l'essai.....	60
4.6 Paramètres d'essai et calculs	62
4.6.1 Paramètres biologiques.....	62
4.6.2 Essais à concentrations multiples	64
4.6.2.1 CLp.....	65
4.6.2.2 CIp.....	66
4.6.2.3 Paramètre du développement.....	70
4.6.2.4 Calcul de la puissance	70
4.6.3 Autres plans d'expérience	71
4.6.3.1 Durée de l'essai	72
4.6.3.2 Paramètres intraorganiques ou non apicaux	74
4.7 Validité de l'essai	77
4.8 Essais employant un toxique de référence.....	77
4.8.1 Essais sublétaux à concentrations multiples avec un toxique de référence	79
4.8.2 Témoin positif	82
4.8.3 Essai de létalité aiguë à concentrations multiples avec un toxique de référence.....	84
4.8.4 Carte de contrôle.....	84
4.9 Considérations relatives à la conservation et au bien-être des animaux.....	86

Section 5

Modes opératoires particuliers pour les essais de toxicité sur des produits chimiques	88
5.1 Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons	88
5.2 Préparation des solutions d'essai	88
5.3 Eau témoin/de dilution	90
5.4 Observations et mesures pendant l'essai	90
5.5 Paramètres d'essai et calculs	91

Section 6

Modes opératoires particuliers pour l'analyse d'échantillons d'eau contaminée.....	92
6.1 Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons	93
6.2 Préparation des solutions d'essai	94
6.3 Eau témoin/de dilution	95
6.4 Observations et mesures pendant l'essai	95
6.5 Paramètres d'essai et calculs	95
6.5.1 Variations des plans d'expérience et de l'analyse	96

Section 7

Rapports à produire	98
7.1 Exigences minimales pour le rapport sur l'essai	98
7.1.1 Substance ou matière d'essai.....	98

7.1.2	Organismes d’essai	99
7.1.3	Installations et appareillage expérimentaux	99
7.1.4	Eau témoin/de dilution	99
7.1.5	Méthode d’essai.....	99
7.1.6	Conditions expérimentales et modes opératoires	99
7.1.7	Résultats	100
7.2	Exigences supplémentaires.....	101
7.2.1	Substance ou matière d’essai	101
7.2.2	Organismes d’essai	101
7.2.3	Installations et appareillage expérimentaux	102
7.2.4	Eau témoin/de dilution	102
7.2.5	Méthode d’essai.....	102
7.2.6	Conditions expérimentales et modes opératoires	103
7.2.7	Résultats	103
Références		104

Annexe A

Méthodes d’essai biologique et guides à l’appui publiés par l’Unité de l’élaboration et de l’application des méthodes d’Environnement et Changement climatique Canada	122
--	------------

Annexe B

Environnement et Changement climatique Canada, laboratoires d’essai environnemental régionaux	125
--	------------

Annexe C

Composition du Groupe intergouvernemental sur l’écotoxicité (en juin 2023)	126
---	------------

Annexe D

Rédacteurs de la méthode et membres du comité d’experts d’examen par les pairs.....	129
--	------------

Annexe E

Modes opératoires supplémentaires pour l’élevage de <i>Lithobates pipiens</i> en laboratoire et modes opératoires généraux pour l’élevage des grenouilles.....	130
---	------------

Annexe F

Modes opératoires pour l’hibernation et l’élevage en laboratoire des spécimens adultes de <i>Lithobates pipiens</i>	136
--	------------

Annexe G

Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais de toxicité.....	143
--	------------

Liste des tableaux

1	Temps approximatifs des stades de développement de <i>Lithobates pipiens</i> à la température d'essai, d'après l'ASTM (2022a) et les données extraites des études interlaboratoires (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b)	21
2	Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés et exigés pour l'élevage des embryons et des larves de <i>Lithobates pipiens</i> destinés à servir dans des essais de toxicité aquatique	26
3	Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés et exigés pour la mise en quarantaine, le maintien et la reproduction de grenouilles adultes de <i>Lithobates pipiens</i> destinées à des essais de mesure de la toxicité aquatique	36
4	Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés et exigés pour les essais de toxicité sur des grenouilles selon leurs stades de développement aquatiques.....	48
5	Exemple de rations alimentaires pour les essais de toxicité	57
6	Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés et exigés pour les essais de toxicité de référence sur des grenouilles selon leurs stades de développement aquatiques	80

Liste des figures

1	Points à considérer dans les préparatifs et la réalisation d'essais de toxicité employant des grenouilles (<i>Lithobates pipiens</i>) selon leurs stades de développement aquatiques et divers types de matières ou de substances d'essai	4
2.1	Stades de développement (SG 1 à SG 25) des embryons et des nouveau-nés d'anoures décrits par Gosner (1960)	19
2.2	Stades de développement (SG 26 à SG 46) des larves et des spécimens métamorphes d'anoures décrits par Gosner (1960).....	20
3	Processus général de l'analyse statistique et de la sélection du modèle convenant le mieux aux données quantitatives sur la toxicité	68

Liste des abréviations, des symboles et des formules chimiques

ANOVA	analyse de variance	M	concentration molaire
AQ/CQ	assurance et contrôle de la qualité	MC	marque de commerce
CaCl ₂	chlorure de calcium	mM	millimole(s)
CaCO ₃	carbonate de calcium	MET	chlorhydrate de métopropramide
C	carbone	Mg	magnésium
Ca	calcium	MgCl ₂	chlorure de magnésium
CIp	concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé, p. ex., CI25)	mg	milligramme(s)
Cl	chlore	mL	millilitre(s)
CL50	concentration létale médiane	mm	millimètre(s)
CLHP	chromatographie liquide à haute performance	mS	millisiemen(s)
CLp	concentration létale correspondant à un pourcentage d'effet (précisé, p. ex., CL25)	<i>n</i>	nombre; ou « taille de l'échantillon »
cm	centimètre(s)	N	azote
CMEO	concentration minimale avec effet observé	<i>N</i>	normalité
COT	carbone organique total	Na	sodium
CRT	chlore résiduel total	NaCl	chlorure de sodium
CSEO	concentration sans effet observé	NaHCO ₃	bicarbonate de sodium
CV	coefficient de variation	NaOH	hydroxyde de sodium
°C	degré(s) Celsius	NH ₃	ammoniac
DEL	diode électroluminescente	NO ₂	nitrite
DEPC	pyrocarbonate d'éthyle	OD	oxygène dissous
ERE	évaluation du risque écologique	<i>p</i>	probabilité
ET	écart-type	s	seconde(s)
g	gramme(s)	SG	stade de Gosner
GnRH-A	agoniste de l'hormone de libération de la gonadotrophine	S.O.	sans objet
h	heure(s)	spp.	espèces
H	hydrogène	t	temps
H&E	hématoxyline et éosine	T4	thyroxine
HCl	acide chlorhydrique	v/v	volume sur volume
HHG	hypothalamo-hypophyso-gonadique	α	alpha, indique une erreur de type I
HHT	hypothalamo-hypophyso-thyroïdien	β	beta, indique une erreur de type II
HNO ₃	acide nitrique	μ g	microgramme(s)
ICP-MS	spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif	μ m	micromètre(s)
j	jour(s)	μ mhos	micromhos
K	potassium	μ mol	micromole(s)
KCl	chlorure de potassium	®	marque déposée
kg	kilogramme(s)	>	plus grand que
L	litre(s)	<	plus petit que
LC-MS	chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse	\geq	supérieur ou égal à
LMC	longueur museau-cloaque	\leq	inférieur ou égal à
m	mètre(s)	%	pour cent
		=	égale(nt)
		+	plus
		-	moins
		\pm	plus ou moins
		\times	multiplié par
		\div	divisé par
		/	par; ou « ou » (p. ex., SG 28/29)
		\approx	approximativement égal à
		\sim	environ

Terminologie

Nota : Toutes les définitions ci-après s'inscrivent dans le contexte du présent rapport. Elles pourraient ne pas être adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

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

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

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 – Accoutumance physiologique à une valeur particulière d'un ou de plusieurs facteurs du milieu tels que la température. Le terme fait habituellement référence à l'accoutumance aux conditions contrôlées de laboratoire.

Adulte – Se dit d'une grenouille ayant atteint la maturité sexuelle. (V. aussi *jeune*, *métamorphose*, *têtard*, *larve*, *nouveau-né* et *embryon*.)

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

Amplexus (latin « embrasser ») – Étreinte copulatoire des grenouilles anoures dans laquelle le mâle saisit la femelle avec ses pattes avant et au cours de laquelle il féconde les œufs libérés par la femelle.

Assurance de la qualité – Programme appliqué dans un laboratoire pour que les travaux scientifiques et techniques arrivent à des résultats précis et exacts. Cela comprend la sélection des bons modes opératoires, le prélèvement des échantillons, le choix des limites, l'évaluation des données, le *contrôle de la qualité* ainsi que les compétences et la formation du personnel.

Callosité nuptiale – Caractéristique sexuelle secondaire présente sur certaines grenouilles mâles matures. Provoquée par les hormones androgènes, cette callosité de reproduction se présente sous la forme d'un gonflement épithélial en pointe sur les pattes avant qui facilite la préhension, utilisé principalement par les mâles pour saisir les femelles lors de l'amplexus (Kouba *et al.*, 2012).

Conductivité – Grandeur physique caractérisant la capacité de conduction du courant électrique par une solution aqueuse. Cette capacité dépend de la concentration des ions dans la solution, de leur valence et de leur mobilité ainsi que de la température de la solution. La conductivité électrique se mesure à 25 °C et elle s'exprime en millisiemens par mètre (mS/m) ou en micromhos par centimètre (µmhos/cm);
1 mS/m = 10 µmhos/cm, selon le système international d'unités (SI).

Conformité – Respect des exigences officielles énoncées dans les règlements ou sur les permis.

Contrôle de la qualité – Actions précises, englobées dans le programme d’assurance de la qualité : normalisation, étalonnage, obtention de sous-échantillons, échantillons témoins et estimations statistiques des limites relatives aux données.

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

Élevage – Stock d’organismes élevés en laboratoire dans des conditions définies et contrôlées afin d’obtenir des organismes d’essai en bonne santé. Ce terme désigne également l’activité visant à produire de tels sujets dans des conditions définies et contrôlées.

Embryon – Individu à tout stade de développement, de la fécondation à l’éclosion (McDiarmid et Altig, 1999). Dans cette méthode, le terme est utilisé pour désigner les stades entre la fécondation de l’œuf et le stade 20 de Gosner (éclosion des têtards). (V. aussi *nouveau-né, larve, têtard, métamorphose, jeune et adulte*).

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

Évaluation du risque écologique (ERE) – Processus d’évaluation des effets nocifs potentiels sur des populations, des communautés et des organismes autres que les humains, en réponse à un stress d’origine humaine. L’ERE s’appuie sur un cadre formel, une analyse ou une modélisation pour estimer l’effet des actions anthropiques sur les communautés, les populations et les organismes présents dans l’environnement et comprendre l’importance de ces effets au regard des incertitudes relevées dans chacun des volets de l’étude (PASCF, 2019).

Floculation – Formation d’un précipité léger non consolidé (c.-à-d. d’un floc) dans une solution.

Frai – Libération d’œufs ou de sperme par des grenouilles adultes matures. Le terme fait aussi référence au comportement lié à l’état de préparation des grenouilles à la libération des gamètes.

Gamètes – Œufs ou spermatozoïdes libérés par les grenouilles adultes matures lors du *frai*.

Hormèse – Stimulation observée de la performance (reproduction) des organismes d’essai, par rapport aux organismes témoins, aux faibles concentrations utilisées dans un essai de toxicité.

Jeune – Grenouille au stade postmétamorphique jusqu’au moment où elle atteint sa maturité sexuelle (McDiarmid et Altig, 1999). (V. aussi *embryon, nouveau-né, larve, têtard, métamorphose et adulte*.)

Larve – Organisme récemment éclos dont les caractéristiques physiques diffèrent de celles observées chez l’adulte. Dans le cas des grenouilles anoures, la période larvaire commence par l’éclosion de l’embryon (stade 20 de Gosner) et dure jusqu’à la fin de la métamorphose (stade 46 de Gosner). Dans le cas des grenouilles anoures, et pour les besoins du présent document, le terme *larve* est synonyme de *têtard*. (V. aussi *embryon, nouveau-né, têtard, métamorphose, jeune et adulte*).

Lot – Groupe unique de têtards issus d’une (c.-à-d. produits par un seul mâle et une seule femelle) ou de plusieurs masses d’œufs, reçus d’un fournisseur ou collectés sur le terrain en une seule fois, et comprenant tous les organismes d’essai destinés à un essai toxicologique donné (y compris tout essai toxicologique de référence connexe). Les larves d’un lot proviennent normalement d’une seule masse d’œufs; toutefois, si une masse d’œufs ne contient pas suffisamment d’organismes d’essai, un lot d’organismes d’essai peut être constitué de têtards provenant de plusieurs masses d’œufs. Le terme *lot* peut également désigner un groupe unique de grenouilles adultes reçu d’un fournisseur ou collecté sur le terrain en une seule fois et qui comprend tous les

organismes d'essai (c.-à-d. servant à la reproduction et à l'élevage en laboratoire) destinés à un essai de toxicité donné (y compris tout essai toxicologique de référence connexe).

Lux – Unité d'éclairement (symbole : lx) par mètre carré. 1 lux = 0,0929 pied-bougie (pied-chandelle) 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 d'éclairement ou l'irradiance sont bien décrites par le flux quantique (débit de fluence photonique) dans la gamme de longueurs d'ondes photosynthétiquement efficaces d'environ 400 à 700 nm. La relation entre flux quantique et lux (bougie-pied) varie énormément en fonction de la source lumineuse, du photomètre utilisé, de la disposition géométrique et des réflexions possibles (v. ASTM, 2022b). Les facteurs approximatifs de conversion entre le flux quantique et le lux sont cependant les suivants :

- sous éclairage fluorescent blanc et cru : 1 lux \approx 0,014 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;
- sous éclairage fluorescent à spectre continu (p. ex. Vita-Lite® de Duro-Test®) : 1 lux \approx 0,016 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$;
- sous éclairage à incandescence : 1 lux \approx 0,019 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ [Deitzer, 1994; Sager et McFarlane, 1997].

Masse d'œufs – Grappe ou grand groupe d'œufs pondus en même temps. La plupart des amphibiens pondent leurs œufs en grappes ou en chapelets, souvent entourés de plusieurs enveloppes gélatineuses. Les femelles *Lithobates pipiens* pondent leurs œufs en grandes grappes sphériques ou elliptiques et ne produisent qu'une seule grappe d'œufs par saison de reproduction; chaque masse d'œufs contient généralement de plusieurs centaines à plus d'un millier d'œufs, mais peut contenir jusqu'à 7 000 œufs (Dewey, 1999; Kendell, 2002; COSEPAC, 2009; Ontario Nature, 2016; Canadian Herpetological Society, 2020). Pour les besoins de cette méthode, une masse d'œufs est un amas globulaire unique d'œufs (fécondés ou non) pondus par une grenouille femelle.

Métamorphose – Têtard qui subit la transformation finale en grenouillettes. Dans le cas des grenouilles anoures, la période de métamorphose commence par l'apparition des membres antérieurs (stade 42 de Gosner) et se poursuit jusqu'à ce que la queue soit réabsorbée et que les grenouillettes sortent de leur habitat aquatique (stade 46 de Gosner). (V. aussi *têtard*, *jeune* et *adulte*.)

Méthode de référence – Protocole particulier d'un essai de toxicité, c.-à-d. méthode d'essai biologique au moyen d'un ensemble explicite de modes opératoires et de conditions expérimentales sur lesquels les parties concernées se sont officiellement entendues, qui est décrite dans un document écrit qu'on appelle également protocole. Contrairement aux autres méthodes polyvalentes (génériques) d'essai biologique publiées par Environnement et Changement climatique Canada, la méthode de référence est souvent réservée aux essais exigés par un règlement particulier.

Nouveau-né – Individu dont le stade de développement se situe entre l'embryon et le têtard (stades 21 à 24 de Gosner), utilisé pour distinguer les individus à ces stades de développement écologiquement uniques des stades d'embryon à têtard (McDiarmid et Altig, 1999). (V. aussi *embryon*, *têtard*, *larve*, *métamorphose*, *jeune* et *adulte*).

Œuf – Ovule sphérique, encapsulé, fécondé ou non.

Opercule – Couverture intégrale de la cavité branchiale d'un têtard grâce à la formation du repli operculaire (excroissance de l'arc hyoïdien aux stades SG 20 à 24 qui finit par former une couverture sur les branchies et les structures connexes et fusionne avec la paroi corporelle selon des schémas qui produisent le spiracle) (McDiarmid et Altig, 1999).

pH – Logarithme négatif de l'activité des ions hydrogène mesurée par leur concentration en moles par litre. Le pH exprime le degré ou l'intensité des réactions acide et alcaline sur une échelle de 0 à 14, où le pH 7 représente la neutralité. Les pH inférieurs à 7 correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus

fortes, tandis que les pH supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

Photopériode – Durée quotidienne de la période d'éclairement.

Pollution – Addition d'une substance, d'une matière ou d'une forme d'énergie telle que la chaleur à un milieu, en une quantité y causant une modification décelable, qui est nocive pour l'utilisation de ce milieu par un organisme ou l'espèce humaine. Il existe des définitions officielles (nationales et internationales) de la pollution, auxquelles il faudrait faire honneur dans les contextes appropriés.

Précipitation – Formation d'un solide (c.-à-d. 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 organismes d'essai.

Protocole – Document exposant avec précision le mode opératoire d'un essai, auquel adhèrent officiellement les parties concernées.

Risque – Probabilité de survenance d'un effet fâcheux.

Spiracle – Une des deux ouvertures de formes et de positions différentes pour la sortie de l'eau pompée par la bouche et la gorge pour la respiration et l'alimentation (McDiarmid et Altig, 1999).

Stade de Gosner (SG) – Système de stades proposé par Gosner (1960) permettant de reconnaître certains repères morphologiques utiles pour comparer la séquence des événements dans le développement des grenouilles, de l'œuf à l'adulte. Ce système de stadification permet des comparaisons entre espèces d'organismes très différents en termes de taille et de période de développement (McDiarmid et Altig, 1999). Sauf indication contraire, l'ensemble des références aux stades de développement (SG) dans le présent document renvoie à celles de Gosner (1960).

Surveillance – Vérification régulière (p. ex. journalière, hebdomadaire, mensuelle, trimestrielle) de la qualité ou de la collecte et de la divulgation des données. Dans le présent rapport, c'est la vérification et la mesure périodiques (régulières), soit de certaines variables biologiques ou de certaines variables de la qualité de l'eau, ou encore, c'est le prélèvement et l'essai de toxicité d'échantillons d'effluent, d'éluent, de lixiviat ou de l'eau réceptrice.

Têtard – Larve au stade exotrophe non reproductrice d'une grenouille entre les stades 25 et 41 de Gosner (McDiarmid et Altig, 1999). (V. *embryon, nouveau-né, têtard, larve, métamorphose, jeune et adulte*).

Turbidité – Degré de réduction de la limpidité de l'eau par la présence de matières en suspension ou autres qui entraînent la diffusion et l'absorption de la lumière, plutôt que sa transmission en ligne droite dans l'échantillon. La turbidité s'exprime généralement en unités de turbidité néphélométrique.

Terminologie des substances ou des matières

Eau d'amont – Eau de surface (p. ex. cours d'eau ou lac) ne subissant pas l'influence de l'effluent (ou d'une autre substance ou matière 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 servant à diluer une substance ou matière d'essai à différentes concentrations aux fins des divers traitements connexes aux essais de toxicité.

Eau déchlorée – Eau chlorée (généralement, eau potable municipale) qu'on a traitée afin d'en éliminer le chlore et ses composés chlorés.

Eau désionisée – Eau ayant été purifiée par passage en colonnes de résines ou par osmose inverse, pour l'en débarrasser des ions tels que Ca^{++} et Mg^{++} .

Eau distillée – Eau que l'on a fait passer dans un appareil de distillation en verre borosilicaté ou autre matériau pour la débarrasser de ses impuretés.

Eau réceptrice – Eau de surface (p. ex. cours d'eau, rivière ou lac) où des déchets ont été, ou sont sur le point d'être, déversés (p. ex. ils sont en amont du point de rejet). D'autres termes doivent être employés afin de préciser le sens de ce terme dans son contexte.

Eau reconstituée – Eau désionisée ou distillée sous verre à laquelle on a ajouté des substances chimiques de qualité réactif. L'eau douce de synthèse ainsi obtenue est exempte de contaminants et possède le pH et la dureté recherchés.

Eau sans chloramine – Eau traitée à la chloramine (généralement, eau potable municipale) qu'on a traitée afin d'en éliminer la chloramine et ses composés.

Eau témoin/de dilution – Eau servant à la dilution de la matière ou de la substance d'essai et utilisée comme eau *témoin* dans un essai.

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

Effluent – Tout déchet liquide (p. ex. industriel ou urbain) rejeté dans l'environnement aquatique.

Élutriat – 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 ou filtration de celui-ci ou par décantation du surnageant.

Essai de détermination de l'ordre grandeur – Essai de toxicité effectué pour obtenir une indication initiale de la toxicité de la matière d'essai dans des conditions définies et pour choisir la plage de concentrations qui sera utilisée dans un essai définitif à concentrations multiples. [V. aussi *essai définitif (de toxicité d'un sol)*.]

Essai définitif (de toxicité) – Se dit d'un essai décisif par opposition à un essai de détermination de l'ordre grandeur. (V. aussi *essai de détermination de l'ordre grandeur*.)

Essai préliminaire – Désigne les deux essais ou plus réalisés en laboratoire, à l'aide d'un toxique de référence, avant d'effectuer des *essais définitifs de toxicité*. Les résultats de ces essais peuvent être utilisés pour démontrer la capacité du laboratoire à respecter les critères de validité des essais et à obtenir des résultats de toxicité uniformes. Les résultats peuvent également servir à établir les concentrations du toxique de référence à utiliser comme concentration du témoin négatif en conjonction avec les essais définitifs de toxicité. [V. aussi *essai définitif (de toxicité d'un sol)*.]

Essai toxicologique de référence – Essai effectué à l'aide d'un *toxique de référence* pour évaluer, pendant le déroulement d'un essai définitif de toxicité, la sensibilité des organismes ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire pour ce toxique au moment où l'on évalue la matière ou la substance d'essai. Tout résultat s'écartant d'un intervalle normal établi rend suspectes la sensibilité des organismes ainsi que la réalisation et la précision de l'essai, et la cause de cet écart devrait être examinée. L'essai de toxicité de référence emploie un étalon chimique.

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

Matière – Ce dont quelque chose est constitué. Ses caractéristiques seraient plus ou moins uniformes. Les effluents, le lixiviat, l’élutriat ou les eaux de surface sont des matières. Habituellement, la matière renferme un nombre plus ou moins grand de substances.

Produit – Préparation du commerce renfermant une ou plusieurs substances chimiques. (V. *produit chimique, substance*.)

Solution mère – Solution concentrée aqueuse de la *substance* ou *matière* d’essai. La *substance* ou la *matière* peut être dissoute dans l’eau (p. ex. *eau de dilution* ou *eau désionisée*) et/ou dans un solvant (v. aussi *témoin du solvant*). On ajoute des volumes mesurés de la solution mère à l’*eau de dilution* pour préparer la concentration voulue des solutions d’essai.

Substance chimique – Tout élément, composé, préparation ou mélange d’un produit chimique qui pourrait se retrouver associé à de l’eau ou y être mélangé.

Substance – Type particulier de matière, aux propriétés plus ou moins uniformes. Le terme a un sens plus restreint que *matière* et pourrait désigner un produit chimique ou un élément chimique particulier.

Témoin du solvant – Échantillon d’eau témoin/dilution dans les essais de produits chimiques insolubles, dans lequel il faut employer un solvant pour solubiliser la substance d’essai avant de la tester dans l’eau. La quantité de solvant employé pour préparer ce témoin doit contenir la même concentration d’agent solubilisant que l’échantillon renfermant la concentration maximale de la substance ou des substances d’essai. Cette concentration de solvant ne devrait pas diminuer les performances des organismes en expérience. Tout essai employant un solvant autre que de l’eau pour la préparation d’une concentration unique ou des concentrations multiples de la substance d’essai doit comprendre un témoin du solvant.

Témoin négatif – V. *témoin*.

Témoin – Dans une enquête ou une étude, variante expérimentale reproduisant tous les facteurs ou toutes les conditions qui pourraient influencer sur les résultats, sauf la condition particulière à l’étude. Dans un essai de toxicité, le témoin doit reproduire toutes les conditions d’exposition, mais il ne doit pas renfermer de matières ou substances contaminées auxquelles on s’intéresse. Le témoin 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). Sauf indication contraire, témoin est synonyme de *témoin négatif*.

Toxique de référence – Substance ou matière étalon servant à mesurer la sensibilité des organismes d’essai afin d’établir le degré de confiance à accorder aux données obtenues sur la toxicité de la substance ou de la matière d’essai. Dans la plupart des cas, on réalise un essai de toxicité avec un toxique de référence pour évaluer la sensibilité des organismes au moment où l’on évalue la matière ou la substance d’essai ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire à l’égard de cette substance.

Terminologie toxicologique et statistique

A priori – Se dit de ce qui est indépendant de l’expérience. Dans le contexte des plans d’expérience et de la statistique, un essai planifié avant la collecte de données constitue un essai a priori. Les objectifs et le plan d’expérience influeraient sur les décisions quant au choix de l’essai a priori à exécuter.

Aigu – Qui se manifeste dans une courte période d'exposition (en secondes, en minutes, en heures ou en quelques jours) relativement à la durée de vie de l'organisme d'essai; on l'utilise généralement pour décrire la durée d'un essai ou de l'exposition.

Ampleur cible avec effet – Ampleur de l'effet négatif dans une étude particulière qui est jugée importante. Dans cette méthode d'essai, l'effet renvoie particulièrement à : i) une réduction de la croissance, exprimée en pourcentage de réduction par rapport au témoin, ou à ii) une réduction (c.-à-d. un retard) ou une augmentation (c.-à-d. une accélération) du développement, exprimée en différence par rapport au témoin (p. ex. 4 stades de Gosner). L'ampleur cible avec effet peut être liée à un énoncé de politique; elle peut aussi être établie en fonction de l'avis des experts, choisie pour s'aligner sur d'autres amplitudes d'effet dans le cadre d'une batterie d'essais de toxicité, ou calculée par d'autres moyens. On établit l'ampleur cible avec effet avant le début de l'essai. Il convient de noter que le fait d'établir l'ampleur cible avec effet ne signifie pas que des effets négatifs seront observés au cours d'un essai particulier; le choix de cette ampleur ne fait que lier le nombre de répétitions à la capacité de l'essai à « détecter » (pour ce qui est de l'importance statistique) un effet, le cas échéant.

Biomasse – Poids humide total de *L. pipiens* survivants dans une répétition, divisé par le nombre d'organismes qui s'y trouvaient au départ (généralement 10). Le paramètre de biomasse représente une combinaison de l'effet subléthal et de la mortalité.

Carte de contrôle – Graphique permettant de suivre l'évolution de l'effet exercé par 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 survient après une période d'exposition relativement longue (semaines, mois, années), habituellement une partie importante de la durée de vie de l'organisme; on l'utilise généralement pour décrire la durée d'un essai ou de l'exposition.

CIp ou concentration inhibitrice (p. ex. 5 mg/kg) correspondant à un pourcentage d'effet (précisé) – Concentration estimative ponctuelle d'une substance ou de matière d'essai causant un pourcentage précisé d'inhibition (p), par rapport au témoin, dans la mesure d'un effet biologique *quantitatif* (continu) tel que la biomasse des organismes d'essai, à la fin de l'essai (p. ex. CI25 ou CI50).

CL50 ou concentration létale médiane – Concentration (exprimée en pourcentage ou en milligrammes par kilogramme, p. ex. % ou mg/kg) d'une ou de plusieurs substances ou matières, qui est censée être létale pour 50 % des organismes d'essai. La CL50 et ses limites de confiance à 95 % sont normalement dérivées de l'analyse statistique du pourcentage des mortalités survenues à chacune des cinq concentrations d'essai ou plus, après une période d'exposition donnée. La durée de l'exposition doit être précisée (p. ex. CL50 14 jours). Selon les objectifs de l'étude, une concentration létale autre qu'une CL50 (p. ex. CL25) pourrait être calculée en remplacement ou en plus de la CL50.

Coefficient de variation (CV) – Pourcentage exprimant le quotient de l'écart-type (ET) d'un ensemble de données divisé par la moyenne de cet ensemble. On le calcule à partir de la formule suivante :
$$CV (\%) = 100 \times (ET \div \text{moyenne}).$$

Concentration minimale avec effet observé (CMEO) – La plus faible des concentrations d'essai causant, chez l'organisme qui y est exposé, un effet négatif statistiquement significatif par rapport au groupe témoin.

Concentration sans effet observé (CSEO) – Concentration maximale de substance ou de matière à laquelle on n'observe aucun effet négatif statistiquement significatif chez l'organisme qui y est exposé, par rapport au groupe témoin.

Données ordinales – Dans un essai de toxicité, il s’agit des données dans lesquelles l’effet mesuré indique une gravité ou un niveau relatif, mais pas un ordre de grandeur. L’adjectif *ordinal* s’emploie ici pour décrire les stades de développement des amphibiens. Ces données sont représentées par les chiffres 1 à 46 décrits par Gosner (1960), les chiffres les plus élevés représentant un développement plus avancé; toutefois, ce développement est défini par la présence ou l’absence de caractéristiques physiques particulières et n’est pas quantifiable autrement (Green *et al.*, 2018). En d’autres termes, la différence entre les stades 21 et 22 n’est pas une progression équivalente dans le développement par rapport à la différence entre les stades 41 et 42, et les amphibiens au stade 42 ne sont pas deux fois plus développés que ceux au stade 21 (Green *et al.*, 2018; John W. Green Ecostatistical Consulting, 2021; v. aussi les fig. 2.1 et 2.2 du présent document). Les *données ordinales* sont analysées à l’aide de méthodes statistiques qui reposent uniquement sur l’ordre indiqué par les étiquettes (c.-à-d. les stades) et ne sont pas induites en erreur par les nombres utilisés uniquement comme étiquettes (John W. Green Ecostatistical Consulting, 2021) (v. § 4.6.2.3 du présent document).

Écotoxicologie – Subdivision de la *toxicologie*. Elle insiste cependant sur les écosystèmes, les communautés naturelles et les espèces sauvages, sans exclure l’espèce humaine des écosystèmes.

Effet quantique – Dans un essai de toxicité, effet auquel chaque organisme d’essai réagit ou ne réagit pas. Par exemple, l’animal pourrait vivre ou mourir, ou se développer normalement ou anormalement. En général, l’effet quantique s’exprime par des dénombrements ou des pourcentages issus de dénombrements. (V. *effet quantitatif*.)

Effet quantitatif – Dans un essai de toxicité, effet dont la valeur mesurée varie de façon continue sur une échelle numérique, par exemple le poids atteint par les organismes individuels à la fin de l’essai. En général, on détermine l’effet quantitatif et on l’exprime par des mesures. (V. *effet quantique*.)

Effet subléthal – Effet négatif subi par un organisme (p. ex. croissance réduite, changement dans le développement) subissant une exposition inférieure à la concentration ou au degré de contamination directement mortelle pendant l’essai.

En conditions statiques – Se dit de l’essai de toxicité pendant lequel on ne renouvelle ni ne remplace la solution (ni aucune substance ou aucun produit chimique s’y trouvant).

Essai à renouvellement continu – Conditions d’essai pendant lesquelles les solutions dans les récipients d’essai sont renouvelées en continu par l’apport constant d’une solution fraîche ou par un apport intermittent fréquent.

Essai à renouvellement périodique – Conditions d’essai de toxicité pendant lesquelles les solutions d’essai sont renouvelées (remplacées) périodiquement, généralement au moins trois fois par semaine en des jours non consécutifs. Synonymes : « renouvellement intermittent », « semi-statique », « renouvellement périodique » et « renouvellement séquentiel ».

Essai de détermination de l’ordre grandeur – Consulter la définition dans la section Terminologie des substances ou des matières.

Essai de toxicité de référence – Consulter la définition dans la section Terminologie des substances ou des matières.

Essai de toxicité – Détermination de l'effet négatif d'une substance ou d'une matière par suite de l'exposition d'un groupe d'organismes choisis, dans des conditions définies. L'essai de toxicité aquatique permet habituellement de mesurer (a) la proportion d'organismes touchés par l'effet (*effet quantique*), et/ou (b) le degré d'effet manifesté (effet *quantitatif* ou gradué), après exposition des organismes d'essai à une substance ou matière d'essai particulière (p. ex. un produit chimique ou un effluent) ou à des concentrations précises de cette substance ou matière.

Essai préliminaire – Consulter la définition dans la section Terminologie des substances ou des matières.

Hétéroscédasticité – Hétérogénéité des résidus que présentent les données dans un nuage de points (v. EC, 2005). Il y a hétéroscédasticité lorsque la variabilité des résidus diffère de façon significative de celle des variables indépendantes (c.-à-d. les concentrations utilisées dans les essais ou les variantes expérimentales). Dans l'analyse statistique et l'évaluation des résidus (p. ex. dans le test de Levine), si les données expérimentales présentent une hétéroscédasticité (c.-à-d. que les résidus ne sont pas homogènes), c'est qu'il existe une différence significative entre la variance des résidus correspondant aux différentes concentrations ou variantes expérimentales utilisées dans l'essai. (V. *homoscédasticité, résidu.*)

Homoscédasticité – Homogénéité des résidus que présentent les données dans un nuage de points (v. EC, 2005). Il y a homoscédasticité lorsque la variabilité des résidus ne diffère pas de façon significative de celle des variables indépendantes (c.-à-d. les concentrations utilisées dans les essais ou les variantes expérimentales). Dans l'analyse statistique et l'évaluation des résidus (p. ex. dans le test de Levine), si les données expérimentales présentent une homoscédasticité (c.-à-d. que les résidus sont homogènes), c'est qu'il n'existe pas de différence significative entre la variance des résidus correspondant aux différentes concentrations ou variantes expérimentales utilisées dans l'essai. (V. *hétéroscédasticité, résidus.*)

Létal – Causant directement la mort chez l'organisme d'essai, c.-à-d. l'interruption de tous les signes visibles de mouvement ou de toute autre fonction de la vie.

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

Moyenne géométrique – Moyenne de mesures répétées, calculée logarithmiquement. Son avantage, contrairement à la moyenne arithmétique, est de faire en sorte que les valeurs extrêmes n'influent pas sur sa propre valeur. On peut la calculer comme la racine énième du produit de n valeurs ou comme l'antilogarithme de la moyenne des logarithmes de n valeurs.

Normalité (ou *distribution normale*) – Désigne une série de données d'observation décrivant une courbe symétrique en forme de cloche. Cette série met en lien la fréquence d'occurrence et l'ampleur 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 plage 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 un bon nombre de tests statistiques, on présume que les données suivent une courbe de distribution normale, de sorte qu'il peut être nécessaire de déterminer si c'est le cas d'un ensemble de données en particulier.

Paramètre – Réaction (il peut y en avoir plus d'une) mesurée des organismes d'essai (p. ex. organismes morts ou biomasse) ou valeur (il peut y en avoir plus d'une) caractérisant les résultats d'un essai (CL_{50} , CI_{25}).

Précision – Accord entre les résultats de plusieurs mesures répétées, c.-à-d. le degré de certitude entourant un résultat ou la petitesse de l'intervalle dans lequel se situe un paramètre calculé statistiquement tel que la CIp.

Répétition – En parlant d'une *variante expérimentale*, d'un *récepteur d'essai* ou d'une *enceinte expérimentale*, le récepteur d'essai renfermant le nombre prescrit d'organismes exposés à l'une des concentrations de la matière ou de la substance d'essai ou celui constituant le groupe témoin, ou encore, le groupe exposé à la matière de référence. La *répétition* d'une variante expérimentale doit être un récepteur d'essai indépendant (v. § 3.3.2 et 4.2 plus loin, et 2.5 dans EC, 2005).

Résidu – Dans le contexte du § 4.6.2.2, l'écart entre l'estimation prédite (modélisée) moins la valeur effectivement observée. (V. *hétéroscédasticité*, *homoscédasticité*.)

Sublétales – Se dit d'une toxicité nuisible à l'organisme, mais à une concentration ou à un degré de contamination inférieur à la concentration ou au degré de contamination directement mortelle pendant l'essai.

Substance toxique – Synonyme de toxique ou matière toxique.

Témoin – Consulter la définition dans la section Terminologie des substances ou des matières.

Test biologique – Test mesurant la concentration ou l'activité d'une substance par la réaction qu'elle provoque chez des organismes vivants. En pharmacologie, un test biologique permet d'évaluer l'activité inconnue d'une préparation donnée d'un médicament par rapport à l'activité connue d'une préparation étalon. Dans le domaine de l'environnement, on utilise plutôt les termes essai de toxicité ou essai toxicologique, qui sont plus précis.

Toxicité aiguë – Effet négatif (létales ou sublétales), discernable, provoqué chez l'organisme d'essai après une courte période d'exposition (quelques jours, habituellement) à une ou plusieurs *solutions d'essai*.

Toxicité chronique – Manifestation d'effets négatifs discernables pendant ou après une exposition relativement longue à un ou à plusieurs contaminants, ces effets étant reliés à des modifications des fonctions de la croissance, du développement, de la capacité de survie ou de toute autre variable biologique (p. ex. le comportement) observée.

Toxicité – Propriété inhérente d'une substance ou d'une matière de provoquer un ou des effets négatifs chez des organismes. Ces effets pourraient résulter d'une exposition à des concentrations *létales* ou *sublétales* de contaminants.

Toxicologie – Science de la toxicité des matières, des substances ou des conditions toxiques. Elle fait appel à une gamme illimitée de disciplines scientifiques, d'outils de laboratoire ou de terrain ou d'études à divers niveaux d'organisation, que ce soit à celui de la molécule ou à celui de l'écosystème en passant par l'espèce et les populations. La toxicologie appliquée se propose normalement de définir la marge de sécurité de l'emploi d'une substance ou d'autres agents. (V. *écotoxicologie*.)

Toxique – Désigne ou qualifie une substance ou une matière ayant des effets néfastes sur des organismes si elle se trouve en quantité suffisante, au bon endroit (c.-à-d. un récepteur ou un organe). *Toxique* est un adjectif ou un adverbe, et, dans certains cas, un nom.

Variante expérimentale – En règle générale, intervention ou procédure dont l'effet doit être mesuré. Plus précisément, dans un essai toxicologique, une variante expérimentale est une condition ou une procédure visant à mesurer les effets d'une substance ou matière sur les organismes d'essai. La variante pourrait consister en une concentration donnée d'une substance ou matière potentiellement toxique, ou encore en une matière d'essai en particulier (p. ex. échantillon de sédiment, de substance chimique, d'effluent, d'élutriat, de lixiviat, d'eau réceptrice ou d'eau témoin). Les échantillons ou les sous-échantillons de matière ou substance d'essai représentant une variante expérimentale particulière sont habituellement répétés dans un essai de toxicité. V. *répétition*.

Remerciements

Ce document a été préparé par Jennifer Miller (Miller Environmental Sciences Inc., Uxbridge (Ontario)). Bonnie Lo et James Elphick (Nautilus Environmental Company Inc., Burnaby (Colombie-Britannique)) sont remerciés pour leur compilation de la recherche sur l'élaboration de la méthode et l'identification des lacunes dans les données et des recommandations de recherche qui ont été utilisées dans la préparation de cette méthode.

Leana Van der Vliet (Section de l'évaluation biologique et normalisation, Environnement et Changement climatique Canada [ECCC]) a joué le rôle d'autorité scientifique pour cette méthode et a fourni un apport technique et une orientation tout au long du travail. Rick Scroggins, Lisa Taylor (retraîtée d'ECCC), et Carolyn Martinko (Section de l'évaluation biologique et normalisation, ECCC) ont apporté une contribution importante à diverses sections du document.

Cette méthode repose principalement sur des recherches menées par le Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique (LEEA) d'ECCC, à Moncton (Nouveau-Brunswick), ainsi que sur des recherches supplémentaires liées à la reproduction des amphibiens menées à l'Université d'Ottawa sous la supervision du Dr Vance Trudeau (Université d'Ottawa, Ottawa (Ontario)). Paula Jackman (retraîtée d'ECCC, LEEA), Ken Doe (retraité d'Environnement Canada, LEEA) et Vance Trudeau sont remerciés pour leurs nombreuses années de recherche. Andrea Edginton est remerciée pour son examen des procédures de culture et d'essai des amphibiens.

Les études inter-laboratoires entreprises pour valider les deux options de la méthode d'essai décrite dans le présent document ont été coordonnées par Leana Van der Vliet et Bonnie Lo (Nautilus Environmental Company Inc., Burnaby (Colombie-Britannique)) et réalisées par les laboratoires participants suivants : LEEA, Moncton, Nouveau-Brunswick ; Nautilus Environmental, Burnaby (Colombie-Britannique); Nautilus Environmental, Calgary (Alberta); et AGAT Laboratories, Laval (Québec). Nous reconnaissons avec gratitude les contributions de tous les participants inter-laboratoires : Virginie Bérubé, Claude Brousseau-Fournier, Sébastien Dupuis, Caroline Leblanc-Houde et Lydia Ranger (AGAT) ; Paula Jackman, Megan Bauer, Lison Hache, Charles Hopper, Dale Hughes et Taylor Shaw (LEEA) ; Bonnie Lo, Eric Cheung, Andy Diewald, Yvonne Lam et Jillian Sones (Nautilus Environmental, Burnaby) ; et Bonnie Lo, Jacklyn Poole, Stephanie Schiffer, Courtney Bogstie, Lindsey Clothier, Linda Fan, et Madison Lehti (Nautilus Environmental, Calgary).

Nous remercions vivement les membres du comité d'experts pour les nombreux commentaires utiles qu'ils ont formulés et qui ont été chargés de l'examen final du présent rapport : Paula Jackman, Doug Fort, Melanie Gallant, Elissa Liu, Bonnie Lo, et Stacey Robinson. Les coordonnées de chaque rédacteur de méthode, contributeur et réviseur figurent à l'annexe D. Nous remercions également Amélie Maure du LEEA pour sa révision de la traduction française. Nous remercions également les membres des Laboratoires régionaux d'essais environnementaux (annexe B) et du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (annexe C) pour leur soutien constant.

Ce projet a bénéficié d'un financement de recherche de la part d'Environnement et Changement climatique Canada pendant de nombreuses années.

Section 1

Introduction

1.1 Contexte

Le déclin mondial de nombreuses espèces d'amphibiens est bien documenté. Ils font partie des taxons les plus menacés par la crise mondiale actuelle de perte de biodiversité (Houlahan *et al.*, 2000; Cohen, 2001; Blaustein et Kiesecker, 2002; Stuart *et al.*, 2004; McCallum, 2007; Wake et Vredenburg, 2008). Les amphibiens représentent de précieux indicateurs biologiques de la qualité des habitats, et leur déclin est très préoccupant. Le déclin des populations est attribué à un certain nombre d'activités anthropiques, notamment : la pollution, l'utilisation de pesticides, la perte ou la modification de l'habitat, les maladies, l'augmentation du rayonnement ultraviolet et les espèces introduites (Blaustein *et al.*, 1994, 1998; Berger *et al.*, 1998; Cohen, 2001; Blaustein et Kiesecker, 2002; Collins et Storfer, 2003; Beebe et Griffiths, 2005; Becker *et al.*, 2007; Boone *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2010; Brühl *et al.*, 2013). De nombreuses causes du déclin des amphibiens restent toutefois inconnues, et les recherches visant à mieux comprendre ces causes se multiplient (Pauli *et al.*, 2000).

De nombreux organismes internationaux ont mis en place des *essais de toxicité* en laboratoire mesurant les effets de l'exposition aquatique aux *substances chimiques* et/ou aux mélanges complexes sur les stades de développement aquatiques des amphibiens, notamment : USEPA, 1975, 1996, 2009, 2015; Birge *et al.*, 1985; ENSR International, 2004; ISO, 2006; OCDE, 2009; ASTM, 2019, 2022a, 2023a, 2023b. Ces méthodes présentent des différences dans leur conception (exposition, espèces à l'étude, stade de développement utilisé au début de l'essai, régimes alimentaires, volume d'essai, etc.), leur durée (de 96 heures à plusieurs semaines) et les mesures des *paramètres* (mortalité, inhibition de la croissance, développement, morphométrie de base des têtards, comportement, histologie des glandes thyroïdiennes, histologie des gonades, etc.), mais elles sont de plus en plus utilisées dans les cadres réglementaires pour mesurer les répercussions des matières anthropiques (v. § 1.4). *Xenopus laevis* est l'espèce d'anoure la plus couramment étudiée, et bon nombre de ces modes opératoires d'essai de toxicité pour les

amphibiens se concentrent sur l'utilisation de cette espèce. La pertinence de cette espèce pour les environnements canadiens est toutefois limitée, puisque *X. laevis* est indigène de l'Afrique. De plus en plus de preuves démontrent leur sensibilité aux contaminants; toutefois, les données sur la *toxicité* pour les amphibiens sont pour le moment sous-représentées dans les évaluations des risques. Le peu de méthodes d'essai normalisées disponibles contribue à cette sous-représentation, et aucune de ces méthodes n'associe les paramètres *chroniques* de l'organisme entier dans le cadre d'une exposition aquatique avec des espèces pertinentes pour les environnements canadiens. Dans le contexte des contaminants environnementaux, les Ranidés ont été la famille d'amphibiens la plus étudiée entre 1996 et 2008 (Sparling *et al.*, 2010). Les chercheurs utilisent des méthodes et des espèces différentes, ce qui, bien souvent, ne permet pas d'effectuer une comparaison directe des contaminants très étudiés (p. ex. les pesticides et les métaux). Une méthode normalisée utilisant une espèce de Ranidé communément étudiée faciliterait ces comparaisons.

Les genres d'anoures les plus couramment étudiés dans les écosystèmes canadiens sont *Rana* et *Bufo* spp. Plus particulièrement, *Lithobates pipiens* (anciennement *Rana pipiens*) est une espèce dont l'aire de répartition naturelle comprend le Canada et qui est couramment utilisée dans les essais de toxicité (Edginton *et al.*, 2004; Fridgen *et al.*, 2007, 2009; Jackman *et al.*, 2007; Hogan *et al.*, 2008; Fridgen, 2009; Melvin et Trudeau, 2012a; Melvin *et al.*, 2013; Leduc *et al.*, 2016; Milotic *et al.*, 2018; Robinson *et al.*, 2019a, 2020, 2021; Young *et al.*, 2020; Gavel *et al.*, 2021). Ce document sur les méthodes d'essai présente le premier mode opératoire normalisé pour l'élevage de l'espèce et la réalisation d'un essai de toxicité aquatique chronique avec cette espèce. *Lithobates pipiens* (communément appelée grenouille léopard) est présent dans l'ensemble des provinces et des territoires à l'exception du Yukon. L'espèce se reproduit dans des étangs chauds peu profonds et hiberne dans des eaux profondes et bien oxygénées (CCCEP, 2011). À la fin des années 1970, la grenouille léopard a connu un déclin rapide de ses populations en

Colombie-Britannique, en Alberta, en Saskatchewan et au Manitoba. Bien que les populations se soient quelque peu rétablies, leur état de conservation passe de « non en péril » à « en voie de disparition » pour les diverses populations du pays (COSEPAC, 2009; EC, 2013b; Comité des espèces en péril, 2013; v. § 1.2).

L'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes (UEAM) d'Environnement et Changement climatique Canada (ECCC) est chargée de l'élaboration, de la normalisation et de la publication (v. annexe A) d'une collection de méthodes d'essai biologique pour la mesure et l'évaluation de l'effet ou des effets *toxiques* subis par une espèce aquatique ou terrestre exposée à des échantillons de *matières* ou de *substances* d'essai dans des conditions contrôlées et définies de laboratoire. Les modes opératoires d'essai biologique normalisés pour *surveiller* et contrôler les substances toxiques et les mélanges complexes sont essentiels à la protection de l'environnement canadien. Les résultats des modes opératoires d'essais *toxicologiques* donnent une estimation globale et intégrée du danger pour l'environnement. Les résultats des tests de toxicité normalisés peuvent être utilisés pour déterminer la nécessité de contrôler les rejets, pour établir des normes relatives aux *effluents* et des lignes directrices relatives à la qualité de l'eau, pour la classification et l'évaluation des risques des substances chimiques, et dans le cadre de *l'évaluation des risques écologiques* des sites.

En 2000, l'UEAM (anciennement Section de l'élaboration et de l'application des méthodes) d'Environnement Canada a commandé une étude visant à passer en revue les modes opératoires actuels d'élevage et d'essais de toxicité sur les amphibiens, à examiner les lignes directrices normalisées existantes et à déterminer les besoins futurs en matière de recherche sur les méthodes (Edginton, 2001). Le présent rapport, associé à une enquête auprès des participants, a servi de base à un atelier du Fonds d'apprentissage sur les modes opératoires d'élevage et d'essai de toxicité sur les amphibiens, qui s'est déroulé sur deux jours en 2002. Cet atelier a donné lieu à un rapport comprenant 18 recommandations sur lesquelles le programme de recherche d'Environnement Canada s'est appuyé.

Depuis plus de 15 ans, Environnement et Changement climatique Canada (anciennement Environnement Canada) parraine des recherches en vue de la normalisation d'une méthode d'essai de toxicité pour les amphibiens utilisant *Lithobates pipiens*. La recherche sur l'élaboration de la méthode a débuté au Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique (LEEA) d'ECCC. De 2010 à 2013, la collaboration avec le Dr Vance Trudeau de l'Université d'Ottawa a permis d'améliorer l'induction du *frai* de la grenouille léopard à la fois pendant la période de reproduction naturelle et en dehors de celle-ci. L'accent mis sur les *protocoles* de reproduction en laboratoire reflète l'engagement de l'UEAM à confirmer la disponibilité de *L. pipiens* pour des essais dans toutes les régions du Canada sans avoir à recourir à des populations sauvages. Au cours des dix dernières années, l'accent a été mis sur l'élaboration de méthodes normalisées pour l'élevage des grenouilles et les essais sur ces dernières (c.-à-d. *L. pipiens*), en particulier les effets chroniques *sublétaux* (c.-à-d. la croissance, le développement) qui se manifestent à la suite d'une exposition de l'ensemble de l'organisme dans un milieu aqueux. Sur la base des résultats de cette recherche, ainsi que des conclusions d'une série d'études de validation de méthodes interlaboratoires (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b), Environnement et Changement climatique Canada a procédé à la préparation et à la publication d'une méthode d'essai biologique pour la réalisation d'essais de toxicité aquatique mesurant la capacité de survie, la croissance et le développement des grenouilles (*L. pipiens*) à différents stades de développement aquatiques, telle qu'il est décrit dans cette méthode.

Un groupe d'experts nationaux et internationaux expérimentés dans la conception et la mise en œuvre d'essais de toxicité sur les grenouilles a participé activement à l'examen critique par les pairs de la quatrième version de ce document méthodologique (v. annexe D).

Deux options pour le plan d'expérience sont décrites dans le présent document. L'essai de 14 jours, conçu principalement pour évaluer la capacité de survie et la croissance des têtards avant la métamorphose, commence par l'exposition de jeunes têtards (c.-à-d. *stade 25 de Gosner* [SG 25]). L'essai de 42 jours, conçu pour saisir les changements dans le développement menant à la métamorphose,

commence par l'exposition de têtards à des stades de développement plus avancés, à partir des premiers stades de développement des bourgeons des membres postérieurs (SG 28/29) et couvrant les stades de différenciation et de développement des orteils (SG 31 à 40). Les deux essais mesurent la capacité de survie (mortalité), la croissance (longueur et poids) et le développement (stade de Gosner) des stades de développement aquatiques de *L. pipiens*. Les déformations sont également évaluées à la fin de chaque essai.

Il est possible d'utiliser l'une ou l'autre des deux options d'essai pour évaluer les échantillons aquatiques. Le choix de l'option d'essai la plus adaptée dépend des objectifs de l'étude et de la nature de la substance d'essai (v. § 2.1). D'autres plans d'expérience, tels que des durées d'exposition plus longues (p. ex. un essai de 56 jours commençant par le SG 25) ou l'évaluation de paramètres supplémentaires (p. ex. histologie, expression génétique), peuvent également être souhaitables, bien qu'ils n'aient pas été normalisés. Le § 4.6.3 propose d'autres plans d'expérience et des paramètres supplémentaires.

La présente méthode décrit les conditions et les modes opératoires universels pour la préparation et la réalisation d'essais sur la grenouille léopard (*Lithobates pipiens*) selon le stade de développement aquatique. Des conseils sont aussi fournis au sujet des ensembles particuliers de conditions et de modes opératoires qui sont exigés ou recommandés lorsque la méthode d'essai biologique vise l'évaluation de différents types de *substances* ou *matières* (p. ex. des échantillons de substance chimique ou eau contaminée; v. fig. 1). Les résultats des essais effectués à l'aide de cette méthode normalisée d'essai de toxicité pour les amphibiens peuvent être utilisés pour l'évaluation des risques écologiques, l'établissement de lignes directrices canadiennes pour la qualité de l'eau, la réglementation des pesticides pour la réévaluation et l'homologation de nouvelles utilisations, l'évaluation et l'homologation de substances commerciales nouvelles et existantes,

et la prise de décision en matière d'assainissement des sites contaminés.

L'évaluation de la toxicité aquatique fait partie intégrante de l'évaluation des dangers et des risques environnementaux liés aux substances chimiques et a donc été incluse dans des lois et des règlements importants régissant l'environnement et les substances chimiques en vigueur partout dans le monde. Les essais utilisant un paramètre de mortalité avec des vertébrés (poissons et amphibiens) posent toutefois des problèmes éthiques et économiques. Il existe un mouvement en faveur de la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques ainsi qu'une demande croissante de stratégies et de méthodes de remplacement, de réduction et de perfectionnement (UE, 2010; Scholz *et al.*, 2013; Halder *et al.*, 2014; Norberg-King *et al.*, 2018). Ainsi, dans la formulation de la méthode d'essai biologique, on a accordé une grande priorité à la réduction du nombre d'organismes d'essai utilisés, à la maximisation du nombre de paramètres d'essai pour améliorer la pertinence de l'essai, ainsi qu'à l'élaboration de modes opératoires pour la fourniture d'organismes d'essai sains avec un impact minimal sur les populations naturelles, ce qui permet d'aborder les questions liées à la conservation et au bien-être des animaux. Consulter le § 4.9 pour plus de renseignements.

On suppose que l'utilisateur possède un certain degré de connaissances ou qu'il connaît dans une certaine mesure les essais de toxicité aquatique, et qu'il suit les protocoles pertinents de gestion de la qualité. Le présent document ne donne pas les consignes explicites qu'il faudrait suivre dans un *protocole réglementaire* ou une *méthode de référence*, bien que le rapport soit destiné à servir de guide utile à cette application et à d'autres.

Pour obtenir des conseils sur la mise en œuvre de ces méthodes et d'autres méthodes d'essai biologique ainsi que sur l'interprétation et l'application des résultats des essais de toxicité aquatique, le lecteur devrait consulter le *Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats* (EC, 1999).

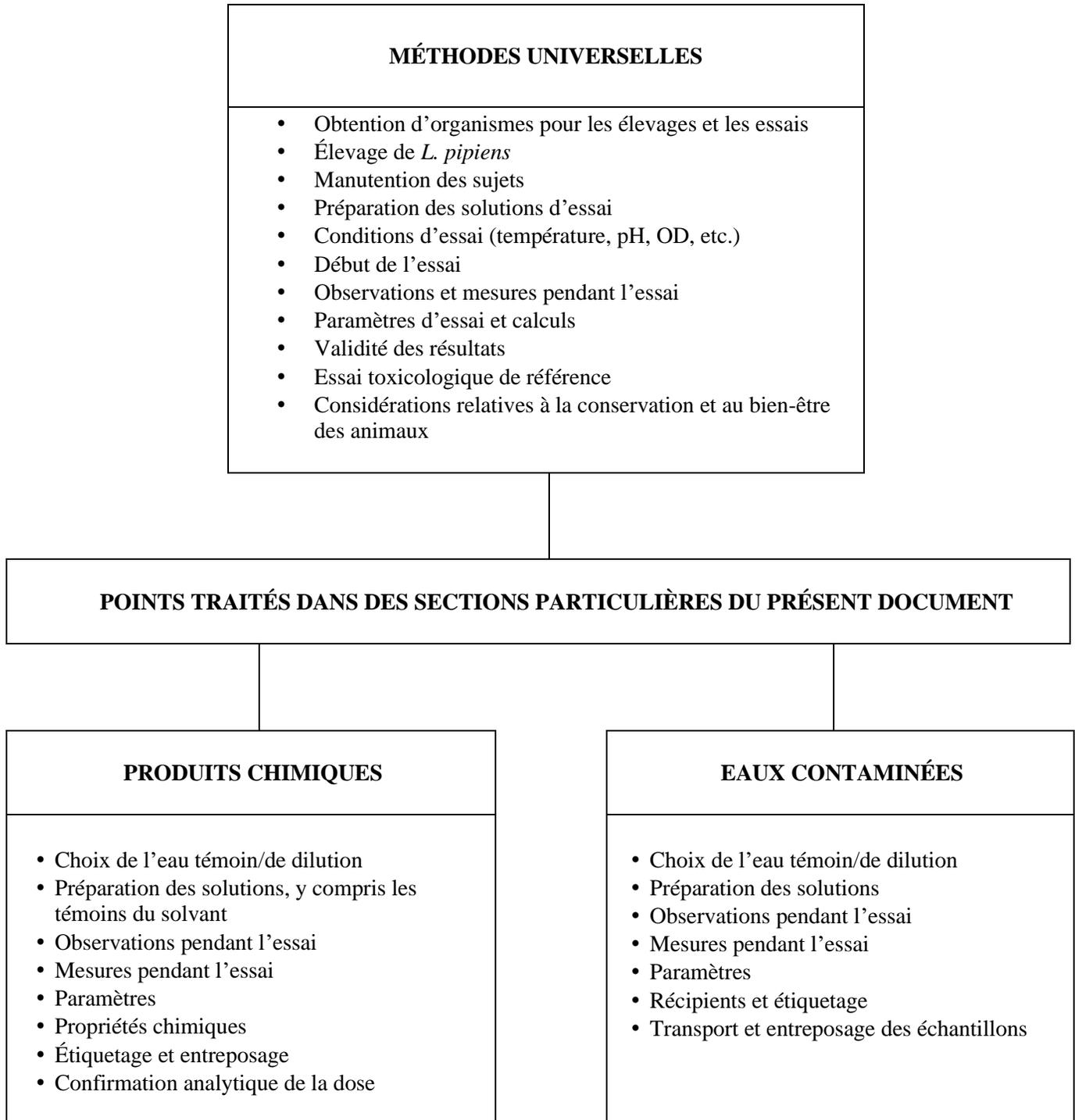


Figure 1. Points à considérer dans les préparatifs et la réalisation d'essais de toxicité employant des grenouilles (*Lithobates pipiens*) selon leurs stades de développement aquatiques et divers types de matières ou de substances d'essai

1.2 Identification, cycle de vie et aire de répartition¹

Lithobates pipiens (anciennement *Rana pipiens*²; Schreber, 1782), communément appelée grenouille léopard (« northern leopard frog », « meadow frog » ou « grass frog » en anglais), est un membre de la famille des Ranidés ou « grenouilles véritables » (embranchement, Chordata; sous-embranchement, Vertebrata; classe, Amphibia; ordre, Anura). C'est une grenouille verte ou brune avec de grandes taches ovales arrondies de couleur brun foncé ou olive, aléatoires, soulignées par des halos clairs sur le dos, les flancs et les pattes. Elle possède deux crêtes dorsolatérales de couleur claire qui bordent son dos depuis l'arrière de chaque œil jusqu'au bas du dos, et une ligne blanche qui s'étend de chaque côté de la bouche, du nez jusqu'à l'épaule. Son ventre est blanc crème (parfois teinté de jaune ou de vert). Les adultes mesurent généralement de 5 à 9 cm de long, mais certains peuvent atteindre 11 cm. Les femelles sont généralement plus grandes que les mâles, mais comme beaucoup d'anoures, les mâles ont des sacs vocaux jumelés qui se gonflent au-dessus de leurs épaules lorsqu'ils chantent, des muscles des membres antérieurs significativement plus lourds, et développent des *callosités nuptiales* sombres et gonflées sur les doigts les plus internes pendant la période de reproduction (Dewey, 1999; COSEPAC, 2009). Au Canada, la grenouille des marais (*Lithobates palustris*) est l'espèce la plus proche de la grenouille léopard. Les taches de la grenouille des marais sont carrées ou angulaires et généralement

¹ Les renseignements fournis dans cette section ont été compilés à partir de plusieurs références, notamment : Dewey, 1999; COSEPAC, 2009; Dodd, 2013; Environnement Canada, 2013b; Ontario Nature, 2016; Canadian Herpetological Society, 2020. Le lecteur devrait consulter ces références pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'identification, le cycle de vie et l'aire de répartition de *L. pipiens*.

² Jusqu'à récemment, toutes les grenouilles de la famille des Ranidés d'Amérique du Nord étaient considérées comme appartenant au seul genre *Rana*. Cependant, Frost *et al.* (2006) ont révisé le genre *Rana*, plaçant ainsi la plupart des « grenouilles véritables » d'Amérique du Nord dans le genre *Lithobates*. Cet arrangement taxonomique a été reconnu par de nombreux experts (p. ex. Che *et al.*, 2007; Collins et Taggart, 2009; Frost *et al.*, 2017), mais a été rejeté par d'autres (p. ex. Hillis, 2007; Pauly *et al.*, 2009).

disposées en deux rangées sur le dos, tandis que les taches de la grenouille léopard sont arrondies ou ovales et disposées de manière plus aléatoire. La grenouille des marais a souvent un ventre jaune et une coloration jaune vif ou orange dans la région de l'aine, et n'est jamais verte. Les grenouilles des marais ne sont présentes que dans l'est du Canada (c.-à-d. au Nouveau-Brunswick, en Nouvelle-Écosse, en Ontario et au Québec).

Outre les caractéristiques diagnostiques décrites ci-dessus, une taxonomie basée sur l'ADN (c.-à-d. les codes à barres) est possible pour *L. pipiens*. L'Organisation internationale de normalisation (ISO) a publié une procédure normalisée pour la détermination des espèces expérimentales écotoxicologiques avec codes à barres de l'ADN (ISO, 2019). Pour *L. pipiens*, le séquençage de la région 5' de la sous-unité 1 de la cytochrome oxydase mitochondriale et le séquençage de la petite sous-unité ribosomique 18S nucléaire à partir de plusieurs échantillons est disponible aux fins de comparaison sur le portail de données International Barcode of Life (code à barres de la vie international) (identifié comme *Rana pipiens*) : www.boldsystems.org. Le Barcode of Life Data Systems (BOLD) est l'une des nombreuses bases de données internationales qui permettent d'accéder aux séquences de codes à barres de l'ADN et qui offrent une plateforme pour leur analyse. Plusieurs études ont également séquencé le gène de la sous-unité 1 de la NADH déshydrogénase mitochondriale de populations canadiennes et américaines de grenouilles léopards (Hoffman et Blouin, 2004; Wilson *et al.*, 2008; O'Donnell et Mock, 2012; O'Donnell *et al.*, 2017).

Il fut un temps où la grenouille léopard présente dans toute l'Amérique du Nord était considérée comme une seule espèce présentant des variations phénotypiques (Moore, 1944, 1975 dans Dodd, 2013); cependant, elle est maintenant reconnue comme un complexe d'espèces d'après les variations dans la structure des chants, la morphologie et la différenciation génétique (COSEPAC, 2009). Le complexe de la grenouille léopard comprend aujourd'hui une vingtaine d'espèces réparties du nord du Canada au Costa Rica (Dodd, 2013). *Lithobates pipiens* est le seul membre du complexe que l'on trouve au Canada (COSEPAC, 2009). Les données relatives à l'ADN indiquent qu'il existe des variantes distinctes à l'Est et à l'Ouest, la limite

coïncidant avec la frontière entre les Prairies et le Bouclier canadien au Manitoba. Il existe également deux haplotypes distincts aux États-Unis, la limite coïncidant avec le fleuve Mississippi et la région des Grands Lacs. Les chercheurs américains se demandent si ces deux variantes constituent ou non deux espèces différentes (Hoffman et Blouin, 2004; O'Donnell et Mock, 2012; O'Donnell *et al.*, 2017); toutefois, le Fish and Wildlife Service des États-Unis (2011) a conclu que la population de l'Ouest de grenouilles léopards ne se distinguait pas des autres populations de grenouilles léopards³. Au Canada, la différenciation génétique entre les populations de la variante de l'Est est considérable, mais elle tend à diminuer dans la variante de l'Ouest (Wilson *et al.*, 2008). Les populations de Colombie-Britannique sont isolées et se distinguent des deux autres haplotypes; ainsi, le Comité sur la situation des

³ Aux États-Unis, plusieurs études ont été menées pour déterminer la diversité génétique des populations de grenouilles léopards. Les données relatives à l'ADN mitochondrial indiquent que *L. pipiens* est divisé en populations regroupant des haplotypes distincts de l'Est et de l'Ouest, la région du fleuve Mississippi et des Grands Lacs divisant les aires de répartition géographique. Le niveau de variation dans l'ADN mitochondrial est relativement élevé (3 à 4 %) et comparable au niveau de divergence observé chez différentes espèces de Ranidés (Hoffman et Blouin, 2004; O'Donnell et Mock, 2012). Les données sur les marqueurs nucléaires correspondent bien aux résultats de l'ADN mitochondrial, avec des différences distinctes entre les populations de l'Est et de l'Ouest et un changement abrupt indiquant une frontière génétique au niveau du fleuve Mississippi (O'Donnell et Mock, 2012). Les séquences d'ADN nucléaire ont également révélé des lignées différentes dans l'Est et l'Ouest, mais celles-ci partageaient une zone d'introgession (c.-à-d. un mélange d'haplotypes) beaucoup plus importante. Toutefois, en réponse à une pétition visant à inscrire la population de l'Ouest de grenouilles léopards en tant que segment de population distinct (SPD) menacé, le Fish and Wildlife Service des États-Unis (2011) a conclu que la population de l'Ouest ne peut être considérée comme nettement distincte des autres populations de l'espèce et ne représente pas un segment de population distinct valide, d'après la vaste zone d'introgession et d'autres données disponibles. Plus récemment, O'Donnell *et al.* (2017) a découvert une majorité d'haplotypes de l'Est dans une région où l'on avait principalement trouvé des haplotypes de l'Ouest auparavant (Hoffman et Blouin, 2004), et a soulevé des inquiétudes quant au croisement éloigné des haplotypes indigènes par rapport aux avantages d'une diversité génétique accrue.

espèces en péril au Canada (COSEPAC, 2009) reconnaît trois unités désignables (UD). Les voici :

- l'UD des montagnes Rocheuses (« en voie de disparition »), qui comprend des populations de la Colombie-Britannique;
- l'UD des Prairies et des terres boréales de l'Ouest (« préoccupante »), qui comprend des populations en Alberta, en Saskatchewan, dans les Territoires du Nord-Ouest et au Manitoba, à l'ouest du Bouclier canadien;
- l'UD de l'Est (« non en péril »), qui comprend les populations du Manitoba, de l'est du Bouclier canadien, de l'Ontario, du Québec et de l'est du Canada.

Outre les situations établies en vertu de la *Loi sur les espèces en péril* énumérées ci-dessus, l'espèce est considérée comme « en voie de disparition » en Colombie-Britannique, « en péril » en Alberta et en Saskatchewan, « peut-être en péril » dans les Territoires du Nord-Ouest et « en sécurité » au Manitoba (COSEPAC, 2009; EC, 2013b; Comité des espèces en péril, 2013). Ces différences dans la situation des populations à l'échelle du pays peuvent avoir des répercussions sur la collecte sur le terrain, l'importation ou l'analyse de *L. pipiens*. Au moment de la rédaction de ce document, les haplotypes de l'Est et de l'Ouest de *L. pipiens* sont toujours reconnus comme une seule espèce (O'Donnell *et al.*, 2017), et les différences de sensibilité entre ces populations de grenouilles léopards n'ont pas été étudiées.

Les grenouilles léopards sont largement répandues en Amérique du Nord, du centre-sud de la Colombie-Britannique au Labrador, et du centre-sud des Territoires du Nord-Ouest jusqu'au centre et au sud-ouest des États-Unis, près du Mexique, au nord-est du Nebraska, à l'est de la Virginie-Occidentale et au nord du Maine; cependant, une étude récente indique que l'espèce est en train de disparaître de certaines régions historiquement habitées des États du Nord-est (Schlesinger *et al.*, 2018). Les grenouilles léopards sont originaires du Canada et sont présentes dans l'ensemble des provinces et des territoires à l'exception du Yukon. Elles ont été introduites sur l'île de Vancouver et à Terre-Neuve, mais on pense qu'elles ont disparu de ces régions. En Colombie-Britannique et en Alberta, les populations se limitent actuellement aux parties sud-est des provinces. *L. pipiens* serait relativement

répandu dans le sud de la Saskatchewan, le sud du Manitoba (plan d'action pour la conservation des prairies de la Saskatchewan, 2018) et l'est du Canada, malgré certains déclin régionaux. On trouve l'espèce dans une grande variété d'habitats, notamment les prairies, les forêts et la toundra.

Elle est semi-terrestre et utilise trois types d'habitats distincts au cours de son cycle de vie. Au cours de l'hiver (d'octobre à mars), les grenouilles hibernent dans des plans d'eau froide et bien oxygénée qui ne gèlent pas, souvent dans des étangs différents de ceux où elles se reproduisent. La reproduction et l'apparition de *larves* ont lieu dans des mares, des étangs, des marais et des lacs, ou même dans des cours d'eau ou des ruisseaux à faible courant. Pendant l'été, on les trouve dans les prairies humides des hautes terres et dans les habitats des prairies indigènes. Les domaines vitaux pouvant atteindre jusqu'à 600 m² sont entretenus pendant l'été.

Les grenouilles sortent de leur hibernation peu après la fonte des glaces au début du printemps. Le chant des mâles rassemblés sur les étangs de reproduction communs, indiquant l'activité de reproduction, commence dès la mi-avril et peut se poursuivre jusqu'en juin dans les régions plus au nord. Les grenouilles se reproduisent dans des étangs relativement permanents, avec ou sans poissons, mais le plus souvent dans des zones humides sans gros poissons. S'il réussit, le mâle maintient la femelle durant l'*amplexus* à l'aide de ses pouces spéciaux, et féconde ses *œufs* lorsqu'ils quittent le corps de la femelle. Chaque femelle s'accouple une fois par an, pond une seule *masse d'œufs* et quitte l'étang, alors que les mâles s'accouplent probablement plus d'une fois. Chaque femelle dépose entre 300 et 7 000 œufs (généralement plusieurs centaines à plus d'un millier) sous la forme d'une masse sphérique ou ovale aplatie qui est souvent fixée à la végétation submergée, sur le fond de l'étang ou flottant à la surface de l'eau. Les œufs de *L. pipiens* ont un diamètre moyen de 2,0 mm (de 1,3 à 2,3 mm) et sont noirs sur le dessus et blancs sur le dessous lorsqu'ils sont libérés. La taille des œufs dépend du temps écoulé après avoir été déposés, car les œufs ont tendance à gonfler après plusieurs jours dans l'eau (Dewey, 1999; Dodd, 2013). Les œufs sont généralement serrés les uns contre les autres, deux à trois enveloppes de gelée entourant chaque œuf (Dodd, 2013). Les œufs éclosent au bout d'une à trois semaines en fonction

de la température de l'eau, mais les petits émergent généralement au bout de neuf jours et passent quelques jours à s'accrocher à la végétation et aux restes de la masse d'œufs avant de devenir des têtards nageant librement.

À l'éclosion, les têtards mesurent de 8 à 10 mm de long. Les têtards atteignent généralement une longueur de 25 mm au niveau du museau-cloaque (longueur totale de 90 mm) avant de commencer l'étape cruciale de la métamorphose (c.-à-d. avant le SG 41) (Comité des espèces en péril, 2013). Ils ont un corps profond, brun foncé ou olive à gris sur le dos, souvent avec des taches dorées, et de couleur crème sur le dessous avec une iridescence de bronze. Leur face ventrale est suffisamment claire pour que les viscères soient visibles à travers la peau et la gorge est translucide (Stebbins, 2003; Dodd, 2013). Les nageoires caudales peuvent être fortement marquées ou non de mouchetures ou de petites taches, et la nageoire caudale dorsale est arrondie. En général, la nageoire caudale est plus claire que le corps, et les yeux sont de couleur bronze (Dodd, 2013). Les têtards sont principalement herbivores, se nourrissant de plantes et d'algues, bien qu'ils puissent à l'occasion se nourrir de têtards morts ou d'invertébrés morts. Leurs principaux prédateurs sont les larves d'insectes aquatiques, les oiseaux aquatiques, les couleuvres, les poissons et les sangsues (Comité des espèces en péril, 2013). Les têtards mettent environ deux à trois mois pour atteindre l'étape de métamorphose, après quoi, en tant que petites grenouilles, ils se déplacent vers l'aire d'alimentation d'été pour se nourrir de divers insectes. Les grenouilles nouvellement métamorphosées mesurent environ 20 à 30 mm de long (Dewey, 1999). Les *jeunes* présentent la même coloration que les adultes (Comité des espèces en péril, 2013). Ils n'atteignent la maturité sexuelle qu'à l'âge de 1 à 3 ans et vivent généralement de 3 à 5 ans dans la nature, bien qu'ils puissent vivre jusqu'à 9 ans en captivité (Dewey, 1999; Comité des espèces en péril, 2013; Ontario Nature, 2016; Canadian Herpetological Society, 2020). Les adultes *L. pipiens* se nourrissent de presque tout ce qu'ils peuvent attraper, mais principalement d'une variété d'insectes et d'autres invertébrés, notamment des coléoptères, des fourmis, des mouches, des vers, des araignées, des escargots et des limaces. La plupart des activités d'alimentation ont lieu la nuit, mais on sait qu'ils se nourrissent pendant la journée si des proies passent à proximité de leur lieu de repos. Les

principaux prédateurs des jeunes et des adultes *L. pipiens* sont les hérons, la sauvagine, les rapaces, les serpents, les tortues, les poissons, les mammifères (p. ex. vison, raton laveur, loutre de rivière et renard) et les grenouilles de plus grande taille (COSEPAC, 2009; Comité des espèces en péril, 2013; Ontario Nature, 2016). Les humains ont utilisé ces grenouilles à des fins scientifiques (à des fins éducatives et pour des essais) et comme nourriture (Comité des espèces en péril, 2013).

1.3 Sensibilité des grenouilles dans les essais de toxicité

Les amphibiens constituent un groupe diversifié d'organismes non ciblés qui ont traditionnellement reçu moins d'attention dans les évaluations écotoxicologiques aquatiques, par rapport aux poissons et aux invertébrés aquatiques (Relyea, 2004b; Jones *et al.*, 2009; Brinkman et Johnston, 2012; Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2018). Sur le plan historique, les données sur la toxicité pour les amphibiens n'ont pas été prises en compte lors de l'évaluation des répercussions des activités anthropiques et des *risques* associés aux substances chimiques rejetées dans l'environnement. Les raisons de leur exclusion sont les suivantes : données limitées sur la toxicité, absence de protocoles d'essai de toxicité en laboratoire normalisés, manque de renseignements sur les paramètres d'exposition et le cycle de vie, et difficultés à estimer l'exposition, en particulier par l'ingestion d'aliments. Cependant, avec la prise de conscience de la sensibilité potentielle des amphibiens, le déclin global des amphibiens et leur importance trophique dans les écosystèmes aquatiques et terrestres, on observe une augmentation substantielle de la recherche sur les effets des substances anthropiques sur les amphibiens et une augmentation de l'utilisation des espèces d'amphibiens dans les enquêtes écotoxicologiques (Sparling *et al.*, 2000, 2010; Edginton, 2001; Hopkins, 2007). Des indications sur la réalisation d'évaluations des risques écologiques pour les amphibiens sont désormais disponibles dans le module 6 du Plan d'action pour les sites contaminés fédéraux (PASCF) publié par Environnement et Changement climatique Canada (PASCF, 2019).

1.3.1 Comparaison avec les poissons

Les grenouilles d'Amérique du Nord jouent un rôle essentiel dans les habitats aquatiques et terrestres et sont des indicateurs importants pour l'écotoxicologie. En raison de leur mode de vie biphasique, il est possible de les utiliser pour surveiller la contamination environnementale dans les milieux aquatiques et terrestres; cependant, leur dépendance à l'égard de l'eau pour la reproduction et les premiers stades de développement, leur peau très perméable et leurs branchies, ainsi que les changements physiologiques et morphologiques complexes qui ont lieu pendant la métamorphose, signifient que les trois stades de développement (c'est-à-dire *embryon*, *larve* et *adulte*) sont susceptibles d'être exposés à une contamination de l'eau (Berrill *et al.*, 1994; Mann *et al.*, 2003; Howe *et al.*, 2004; Melvin et Trudeau, 2012a).

Malgré la complexité des caractéristiques du cycle de vie des amphibiens, les poissons sont souvent utilisés à la place des amphibiens dans l'évaluation des risques, en partant du principe que les décisions réglementaires fondées sur la toxicité observée pour les poissons protégeront également les phases aquatiques du cycle de vie des amphibiens. Pour valider cette hypothèse, un certain nombre d'études ont évalué la sensibilité relative des composés dans les expositions aquatiques des espèces de poissons et d'amphibiens. Les conclusions et les interprétations scientifiques des données ont varié. Des données probantes indiquent que les amphibiens sont plus sensibles que les poissons aux contaminants aquatiques, y compris certains métaux (Birge *et al.*, 2000; Bridges *et al.*, 2002), les phénols (Kerby *et al.*, 2010; Weltje *et al.*, 2013; Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2018) et les pesticides (Aldrich, 2009; Weltje *et al.*, 2013; Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2018; Glaberman *et al.*, 2019), ainsi que le perchlorate, un perturbateur thyroïdien connu (Weltje *et al.*, 2013). D'autres études ont démontré la possibilité que les données de toxicité établies à partir des poissons ou des invertébrés ne soient pas pertinentes pour les amphibiens (Relyea 2004b, 2005b; Ortiz-Santaliestra et Brühl, 2014). Cela n'est pas inattendu en raison des grandes différences dans leur cycle de vie, leur physiologie, leur respiration, leur immunologie et leur endocrinologie, entre autres. Cependant, plusieurs études ont conclu que, dans l'ensemble, les poissons (Weltje *et al.*, 2013; Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2018) et les invertébrés (Aldrich, 2009) présentent la même sensibilité, voire une plus

grande sensibilité, que les amphibiens aux expositions chimiques *aiguës*, lorsque les caractéristiques importantes des plans d'expérience (durée, critère d'évaluation, niveau d'effet) sont constantes. Des conclusions semblables sur la sensibilité ont été proposées pour les expositions chimiques chroniques (Glberman *et al.*, 2019; Weltje *et al.*, 2013), bien que la pertinence des données sur les poissons pour l'exposition chronique mérite une discussion plus approfondie.

Birge *et al.* (2000) ont exposé des embryons-larves de diverses espèces d'amphibiens et de poissons à 27 composés organiques et 34 composés inorganiques (y compris des métaux), de la fécondation jusqu'à quatre jours après l'éclosion, et ont comparé les *CL50* qui en résultent. Dans l'ensemble, environ la moitié des 25 espèces d'amphibiens se sont révélées plus tolérantes aux composés d'essai que la truite arc-en-ciel (*O. mykiss*), l'espèce de poisson la plus sensible. Les amphibiens présentaient des *CL50* inférieures à celles de l'espèce *O. mykiss* dans 52 % des 203 cas pour les métaux et dans 36 % des 44 cas pour les composés organiques. Certains composés ont suscité des réactions très diverses parmi les espèces, tandis que pour d'autres composés, plusieurs espèces d'amphibiens ont montré une sensibilité semblable à *O. mykiss*.

D'autres études ont déterminé que les données sur la toxicité des amphibiens et des poissons présentent une forte corrélation positive et que les amphibiens seraient protégés dans la plupart des cas en appliquant un facteur de sécurité de 100× aux données sur les poissons (Aldrich, 2009; Doe *et al.*, 2012; Weltje *et al.*, 2013; Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2018; Glberman *et al.*, 2019). Bridges *et al.* (2002) ont mesuré les valeurs de la *CL50* après 96 h de cinq produits chimiques ayant différents modes d'action chez des grenouilles léopards (*Rana sphenoccephala*) et les ont comparées aux *CL50* après 96 h publiées dans le cadre d'essais de toxicité normalisés sur les poissons. Les résultats ont montré que les têtards présentaient une tolérance égale ou supérieure à celle des poissons pour toutes les substances, à l'exception du cuivre, et que toutes les différences de toxicité étaient 10 fois inférieures par rapport aux données de la truite arc-en-ciel et de la tête-de-boule (*Pimephales promelas*). Dans une étude de 24 pesticides réalisée par Aldrich (2009), la sensibilité aiguë des amphibiens était inférieure ou

équivalente à celle des invertébrés et des poissons, sauf dans deux cas (diméthoate et 2,4-D) où la *CL50* après 96 h pour l'amphibien le plus sensible était inférieure à celle de l'invertébré ou du poisson le plus sensible. Une étude réalisée par Weltje *et al.* (2013) a également montré que les amphibiens n'étaient pas plus sensibles que les poissons et que, dans certains cas, ils l'étaient beaucoup moins. Les amphibiens présentaient des *CL50* après 96 h inférieures à celles des poissons pour 16 des 55 substances, mais cette différence était 10 fois inférieure dans 10 cas et 100 fois supérieure uniquement pour le *p*-nonylphénol et le diméthoate. De même, une analyse comparative des *CL50* après 96 h pour 29 préparations pesticide testées au LEEA a conclu que les larves de grenouille léopard n'étaient pas plus sensibles que les jeunes *O. mykiss* dans des conditions normalisées, et que les données de *toxicité aiguë* étaient fortement corrélées pour ces espèces (Doe *et al.*, 2012; Martinko et Van der Vliet, 2021; Environnement et Changement climatique Canada, 2023). Enfin, les amphibiens étaient plus sensibles que l'espèce *O. mykiss* à 34,2 % des 117 substances chimiques examinées par Ortiz-Santaliestra *et al.* (2018), mais pas plus sensibles à un groupe particulier de substances. L'étude a également montré que l'application d'un facteur de sécurité de 100 aux données relatives à la *CL50* après 96 h pour *O. mykiss* permettrait de protéger les amphibiens pour 94,9 % des substances évaluées. Dans l'ensemble, les données montrent que les poissons, en particulier *O. mykiss*, peuvent être un substitut approprié pour les larves d'amphibiens, en utilisant une exposition de 96 h et la létalité (*CL50*) comme critère d'évaluation⁴. Il faudrait toutefois noter que le Plan d'action pour les sites contaminés fédéraux a récemment déclaré que, compte tenu des différences dans le cycle de vie, il ne recommande pas d'utiliser les données sur la toxicité des poissons comme substitut pour les amphibiens dans l'évaluation des risques, à moins que les données sur les amphibiens ne soient pas disponibles (PASCF, 2019). Si les données de toxicité pour les poissons sont utilisées comme substitut, le PASCF (2019) recommande d'inclure des éléments de preuve

⁴ La plupart des comparaisons effectuées jusqu'à présent ont utilisé la *CL50*. Puisque les pentes des relations dose-réponse peuvent différer, une tendance dans les *CL50* entre les poissons et les amphibiens n'indique pas une tendance dans d'autres paramètres de mortalité (p. ex. la *CL10*).

supplémentaires qui évaluent plus directement le risque pour les amphibiens, ainsi qu'une analyse d'incertitude complète relative à l'utilisation des données sur les espèces substitutives.

La plupart des données publiées se sont concentrées sur les expositions à court terme qui mesurent l'effet des substances ou des matières sur la capacité de survie uniquement; cependant, il existe de plus en plus de preuves que ces expositions à court terme sous-estiment sérieusement les effets négatifs potentiels sur les amphibiens (Relyea, 2004b; Chen *et al.*, 2007). Par rapport aux expositions aiguës, les études sur les expositions chroniques chez les amphibiens sont relativement rares. Les essais de toxicité chronique prolongent la période d'exposition, qui reflète souvent mieux les expositions environnementales. En outre, les expositions chroniques permettent de mesurer *les effets sublétaux* et peuvent couvrir une réorganisation complète du système physiologique (métamorphose), ce qui n'est tout simplement pas le cas chez les poissons. La comparaison des expositions chroniques entre les poissons et les amphibiens est plus problématique que dans le scénario de toxicité aiguë, car la durée, l'effet biologique et l'ampleur de l'effet varient dans les études de toxicité chronique. Dans le scénario de toxicité aiguë, la durée (96 h), l'effet biologique (mortalité) et l'ampleur de l'effet (50 % de mortalité) sont définis et souvent uniformes d'une étude à l'autre. La durée des essais de toxicité chronique peut correspondre à un nombre quelconque de semaines ou de mois. Les effets biologiques dans une étude de toxicité chronique peuvent être la croissance, le développement et/ou la mortalité. L'ampleur de l'effet est généralement indéfinie ou mal définie, car les données *quantitatives* résultant d'expositions chroniques sont souvent analysées en utilisant la concentration sans effet observé (*CSEO*) et la concentration minimale avec effet observé (*CMEO*).

Weltje *et al.* (2013) ont conclu que les amphibiens étaient beaucoup moins sensibles que les poissons aux expositions chroniques à 52 composés, à l'exception du perchlorate de sodium; toutefois, leur évaluation a comparé des essais de durées différentes et des paramètres CSEO non uniformes. Les résultats doivent donc être interprétés avec prudence. Glaberman *et al.* (2019) ont pu surmonter certains de ces problèmes en comparant les

paramètres de capacité de survie, de poids corporel et de longueur provenant d'essais normalisés avec des expositions de 21 jours (Essai de métamorphose des amphibiens [AMA] utilisant *Xenopus laevis* et Essai à court terme de reproduction des poissons [FSTRA] utilisant *Pimephales promelas*) pour 45 pesticides. Les auteurs ont constaté une forte corrélation positive entre les résultats de l'AMA et ceux du FSTRA, et les amphibiens se sont montrés plus sensibles que les poissons environ la moitié du temps. Les amphibiens ont présenté une sensibilité 10 fois supérieure pour les différents paramètres pour un maximum de six pesticides, et une sensibilité 100 fois supérieure en ce qui concerne la capacité de survie pour le seul fongicide propiconazole. Glaberman *et al.* (2019) ont également souligné l'importance d'évaluer les effets des composés potentiellement perturbateurs de la thyroïde chez les amphibiens et, comme d'autres auteurs (Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2018), ont appelé à poursuivre les recherches pour générer des données de toxicité chronique chez les amphibiens. Enfin, bien que les données sur la toxicité de *Xenopus laevis* soient largement disponibles et fréquemment incluses dans les comparaisons entre les poissons et les amphibiens, cette espèce peut être moins sensible que d'autres espèces d'amphibiens (Birge *et al.*, 2000; Kerby *et al.*, 2010; Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2018). Cela souligne l'importance de générer des données sur la *toxicité chronique* avec des espèces d'amphibiens plus pertinentes, plus sensibles et plus indigènes, telles que *L. pipiens*.

1.3.2 Comparaison entre les différents stades de développement aquatiques

Les amphibiens présentent de nombreux stades de développement aquatiques uniques. La sensibilité de ces stades (c.-à-d. embryonnaires, larvaires ou ceux de la métamorphose) peut varier en fonction du stade de développement exposé, de la substance évaluée et/ou du paramètre biologique (Biga et Blaustein, 2013). La métamorphose représente un changement physiologique unique qui peut être particulièrement sensible aux perturbations.

En tant qu'organismes aquatiques qui se reproduisent, les œufs et les larves d'amphibiens sont particulièrement vulnérables aux substances chimiques présentes dans leur environnement (Blaustein *et al.*, 2003). Contrairement à la plupart des taxons où l'on considère que les premiers stades de développement sont les plus sensibles, les

organismes ayant des œufs dotés d'une protection, comme les amphibiens, ont plusieurs couches de gelée qui les protègent d'un certain nombre de perturbations externes (Marquis *et al.*, 2006). Toutefois, le degré de protection de l'embryon en développement contre la substance chimique que permet la couche de gelée entourant les œufs d'amphibiens dépend fortement de la substance chimique et de l'espèce étudiée (Greulich et Pflugmacher, 2004). Les embryons d'amphibiens sont probablement exposés à des polluants environnementaux, car la gelée est remplie d'eau peu après la ponte (Marquis *et al.*, 2006), bien qu'il s'agisse d'un scénario d'exposition difficile à saisir dans une méthode d'essai normalisé. En outre, l'absorption de contaminants d'origine hydrique a été observée dans les œufs d'anoues (Greulich et Pflugmacher, 2004).

Les stades larvaires des amphibiens se sont révélés au moins aussi sensibles, et souvent plus sensibles, aux contaminants chimiques que les embryons (Berrill *et al.*, 1993, 1994, 1998; Edginton *et al.*, 2003; Edginton *et al.*, 2004; LEEA, 2009; Wagner *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013) et les *nouveaux-nés* (Berrill *et al.*, 1998; Howe *et al.*, 2004). Certaines études ont montré que les premiers stades larvaires sont souvent les plus sensibles aux contaminants chimiques (Chen *et al.*, 2007) alors que d'autres études ont observé une plus grande toxicité chez les têtards plus âgés (Earl et Whiteman, 2009; Melvin et Trudeau, 2012b; Martini *et al.*, 2012). Conformément à ces conclusions, les options d'essai décrites dans la présente méthode d'essai commencent par les stades larvaires des amphibiens (SG 25 et SG 28/29), ce qui permet de concentrer l'exposition sur les stades de développement aquatiques les plus sensibles et peut-être les plus pertinents de *L. pipiens* et d'éviter l'utilisation d'organismes d'essai pour les essais à faible impact (c.-à-d. les essais portant sur des stades de développement moins sensibles tels que les embryons; v. § 2.1 et 4.6.3 et la note de bas de page 98).

1.4 Utilisation des grenouilles dans les essais de toxicité

On observe une hausse de la demande de données de qualité sur les amphibiens pour l'évaluation des risques écologiques, l'établissement de lignes

directrices sur la qualité de l'environnement, les programmes de réglementation des pesticides, ainsi que pour l'évaluation et l'homologation de nouveaux produits chimiques et substances. Les États-Unis (EDSP [Endocrine Disruptor Screening Program]), le Japon (EXTEND [Extended Tasks on Endocrine Disruption]) et l'Union européenne (REACH [Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals]) disposent tous d'une législation exigeant des données sur l'écotoxicité pour dépister les effets perturbateurs des substances chimiques sur le système endocrinien. D'autres règlements de l'Union européenne exigent désormais que les données disponibles sur les amphibiens terrestres soient prises en compte lors de l'évaluation des risques liés aux substances actives, et s'il est impossible de prévoir le risque à partir de ces données, il doit être traité d'une autre manière (Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2017). Le groupe scientifique sur les produits phytopharmaceutiques et leurs résidus de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (groupe PPR EFSA, 2018) encourage également le développement d'un système d'évaluation des risques liés aux pesticides pour les amphibiens, y compris des données sur les expositions chroniques dans les environnements aquatiques et terrestres.

L'un des protocoles internationaux les plus détaillés pour les essais de toxicité sur les amphibiens aquatiques est la Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques : Essai de métamorphose des amphibiens (AMA; OCDE, 2009), qui a été conçu comme un *essai préliminaire* pour déterminer les substances qui interfèrent avec l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien. Cet *essai biologique* expose des têtards *Xenopus laevis* pendant 21 jours, ce qui est suffisant pour que les têtards témoins atteignent la phase de métamorphose. Cet essai est recommandé en vertu du Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques potentiellement perturbateurs endocriniens. Plus récemment (juillet 2015), l'Environmental Protection Agency des États-Unis (EPA des États-Unis) a publié un document de méthode d'essai harmonisé à l'échelle mondiale intitulé « Essai de croissance et de développement de larves d'amphibiens (LAGDA) » dans le cadre d'une série de lignes directrices d'essai à utiliser dans l'Endocrine Disruptor Screening Program (programme de dépistage des perturbateurs endocriniens) qui doit également être inclus dans le

Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens. Ces lignes directrices, établies par l'Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (OCSPP), doivent être utilisées pour analyser les pesticides et les substances chimiques. Ce document fournit des lignes directrices pour la réalisation d'essais de toxicité à l'aide de *X. laevis*, de l'embryon au stade de développement larvaire, à la métamorphose et aux premiers stades du développement des jeunes. L'essai est conçu non seulement pour détecter les effets de la perturbation endocrinienne, mais aussi pour évaluer les effets de l'exposition aux contaminants, grâce à des mécanismes endocriniens et non endocriniens, et il devrait être sensible à de nombreuses substances chimiques ainsi qu'à d'autres substances *toxiques* pour la reproduction. Les paramètres évalués au cours de l'exposition comprennent la mortalité, les comportements anormaux et les facteurs déterminants de la croissance (p. ex. la longueur et le poids), ainsi que les paramètres de développement (p. ex. la durée jusqu'à la métamorphose, les anomalies de développement) et les paramètres histopathologiques (USEPA, 2015).

D'autres protocoles internationaux ont été élaborés et contiennent des renseignements limités concernant la méthode décrite ici :

- Rapport technique TR-2245-ENV de la Naval Facilities Engineering Command (NAVFAC) : il s'agit d'un essai de toxicité des sédiments qui expose *L. pipiens* ou *Bufo americanus* à des sédiments recouverts d'eau pendant 10 jours. On utilise des têtards âgés de ≤ 72 heures. Les organismes sont nourris après que les têtards ont atteint le stade 25 de Gosner. Les paramètres sont la survie, la longueur et la largeur du corps (ENSR International, 2004).
- ASTM-E2591-22 : ce protocole décrit une méthode pour les essais de toxicité sur les sédiments entiers à l'aide de *L. pipiens*. Les conditions d'essai et les paramètres sont très semblables à ceux décrits par ENSR International (2004) (ASTM, 2022a).
- EPA-712-C-96-132 (OPPTS 850.1800) : ce protocole est un essai de toxicité subchronique sur les sédiments mis en place pour *Rana catesbeiana*. Il s'agit d'un essai de 30 jours mis en œuvre avec des têtards aux stades 31-34 de Gosner (USEPA, 1996).
- EPA 740-C-09-002 (OPPTS 890.1100) : cette méthode est compatible avec l'essai de métamorphose des amphibiens de l'OCDE – n° 231 décrit précédemment (USEPA, 2009).
- APHA 8930 : ce document décrit les modes opératoires des essais de toxicité aiguë et quelques recommandations pour les essais de toxicité chronique utilisant *Xenopus laevis* ou *Rana (Lithobates)* (APHA *et al.*, 2011).
- ASTM-E1192-23 : ce document fournit des orientations pour la réalisation d'essais de toxicité aiguë sur des échantillons aqueux (eaux, effluents et lixiviats) avec des poissons, des macro-invertébrés et des amphibiens. Les lignes directrices relatives aux essais sont génériques et ne visent pas particulièrement les amphibiens (ASTM, 2023a).
- ASTM-E729-23e1 : ce document fournit des orientations pour la réalisation d'essais de toxicité aiguë sur des matières d'essai (c.-à-d. des substances chimiques) ajoutées à l'*eau de dilution* avec des poissons, des macro-invertébrés et des amphibiens. Les lignes directrices d'essai sont génériques et ne visent pas particulièrement les amphibiens (ASTM, 2023b).
- ASTM-E1439-12 (FETAX) : le protocole FETAX a été élaboré pour être particulièrement utilisé avec *Xenopus laevis*, une espèce non indigène. La durée de l'essai est de 96 heures et commence par un embryon décongelé au stade de la blastula moyenne ou de la gastrulation précoce. Au cours de la période d'exposition, les organismes se transforment en têtards, et la longueur tête-queue peut servir de paramètre (ASTM, 2019).
- GB/T 31270.18 : il s'agit d'un essai de toxicité aiguë qui utilise des larves de *Rana limnocharis* (originaire de certaines régions de Chine et d'Asie du Sud-Est) ou de *Xenopus laevis* pour évaluer les pesticides. La durée est de 96 heures et le paramètre utilisé est la survie, mais des signes de toxicité, y compris un comportement anormal, sont également signalés (ICAMA, 2014).
- ISO 21427-1 Évaluation de la génotoxicité par le mesurage de l'induction de micronoyaux – Partie 1 : Évaluation de la génotoxicité à l'aide de larves d'amphibiens : cette méthode est utilisée pour évaluer la génotoxicité pour les larves de *Xenopus laevis* et *Pleurodeles waltl*

après une exposition aquatique de 12 jours (ISO, 2006; Mouchet *et al.*, 2011).

Les méthodes d'essai de l'ASTM (2022a) et de la NAVFAC (ENSR International, 2004) contiennent certaines orientations (p. ex. maintien/élevage, manipulation, détermination du stade) qui étaient pertinentes pour la méthode d'essai décrite ici, dans la mesure où *L. pipiens* est l'espèce d'essai recommandée.

Des études approfondies ont été réalisées pour résumer les questions liées à l'écotoxicologie des amphibiens, y compris, sans toutefois s'y limiter : Sparling *et al.*, 2000, 2010; Mann *et al.*, 2009; Egea-Serrano *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2019; Sievers *et al.*, 2019; Trudeau *et al.*, 2020. Le lecteur est invité à consulter ces manuels et documents de synthèse, ainsi que les références qui y sont citées, pour plus de détails.

Les effets toxiques résultant de l'exposition chronique de *L. pipiens* et d'autres espèces communes de grenouilles anoures à divers contaminants environnementaux ont été documentés dans le cadre d'études en laboratoire portant sur des échantillons de :

- **Pesticides** (Allran et Karasov, 2000; Howe *et al.*, 2004; Relyea, 2004a, 2004b, 2005a, 2005b; Orton *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2009; Shenoy *et al.*, 2009; Williams et Semlitsch, 2010; Weir *et al.*, 2012; Biga et Blaustein, 2013; Boone *et al.*, 2013; Brühl *et al.*, 2013; Higley *et al.*, 2013; Yahnke *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2019a, 2021; Gavel *et al.*, 2021);
- **Métaux** (Baud et Beck, 2005; Gross *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2007, 2009; Araújo *et al.*, 2014; Leduc *et al.*, 2016);
- **Substances per- et polyfluoroalkylées** (Hoover *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2021);
- **Solvants** (Young *et al.*, 2020);
- **Effluents d'eaux usées** (Sowers *et al.*, 2009);
- **D'autres substances chimiques** (Mackenzie *et al.*, 2003; Ankley *et al.*, 2004; Fraker et Smith, 2004; McDaniel *et al.*, 2004; Sanzo et Hecnar, 2006; Hogan *et al.*, 2008; Croteau *et al.*, 2009;

Earl et Whiteman, 2009, 2010; Paden *et al.*, 2011; Melvin et Trudeau, 2012a, 2012b; Van Schmidt *et al.*, 2012; Marlatt *et al.*, 2013; Tompsett *et al.*, 2013; Stanley *et al.*, 2015; Milotic *et al.*, 2017, 2018; Pillard *et al.*, 2017; Robinson *et al.*, 2020);

- **Rayonnement ultraviolet** (Baud et Beck, 2005; Croteau *et al.*, 2009).

Les paramètres traditionnels couramment examinés dans les études écotoxicologiques chroniques utilisant des grenouilles sont les suivants :

- Succès d'éclosion
- Survie (mortalité)
- Croissance (longueur et poids; taux de croissance)
- Développement (pourcentage de métamorphose; durée jusqu'à la métamorphose ou résorption de la queue, et/ou stade de développement à la fin de l'essai)
- Anomalies morphologiques
- Analyse histologique (p. ex. glande thyroïde).

De plus en plus de paramètres non classiques sont utilisés comme solutions de rechange pour mesurer les effets de substances chimiques particulières ou pour déterminer des effets liés à des « modes d'action » particuliers. En outre, en fonction des caractéristiques des plans d'expérience, les paramètres de rechange peuvent contribuer aux stratégies de remplacement, de réduction et d'amélioration des essais menés sur les vertébrés. Parmi les paramètres non classiques, on peut citer :

- perturbation endocrinienne, y compris l'essai de biopsie de la nageoire caudale du têtard d'élevage [nageoire-E] (Crump *et al.*, 2002; Croteau *et al.*, 2009; Hinthner *et al.*, 2010a, 2010b; Hersikorn et Smits, 2011; Smits *et al.*, 2012; Tompsett *et al.*, 2013; Wojnarowicz *et al.*, 2013);
- physiologie (Goulet et Hontela, 2003; Smits *et al.*, 2012; Melvin *et al.*, 2013; Gavel *et al.*, 2021; Robinson *et al.*, 2021);
- comportement, y compris l'activité de nage et l'évitement (Fraker et Smith, 2004; Chen *et al.*, 2007; Sowers *et al.*, 2009; Storrs Méndez *et al.*, 2009; Paden *et al.*, 2011; Biga et Blaustein, 2013; Araújo *et al.*, 2014; Stanley *et al.*, 2015; Heerema *et al.*, 2018);

- l'expression génétique (Howe *et al.*, 2004; Higley *et al.*, 2013);
- biopuce à produits PCR quantitative EcoToxChip (Basu *et al.*, 2019; Crump *et al.*, 2023; www.ecotoxchip.ca/);
- transcriptomique (Jackman *et al.*, 2018);
- métabolomique (Melvin *et al.*, 2017);
- différenciation sexuelle (Mackenzie *et al.*, 2003; Orton *et al.*, 2006; Hogan *et al.*, 2008; Sowers *et al.*, 2009; van Schmidt *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2020; Young *et al.*, 2020);
- stress lié aux prédateurs ou aux parasites (Relyea, 2004b, 2005b; Budischak *et al.*, 2009; Milotic *et al.*, 2017, 2018; Robinson *et al.*, 2019a; Brown *et al.*, 2021; Gavel *et al.*, 2021).

Xenopus laevis (dactylèthre de l'Afrique du Sud) est l'espèce d'anoure la plus couramment étudiée, et les modes opératoires des essais de toxicité publiés pour les amphibiens se sont historiquement concentrés sur l'utilisation de *X. laevis* (ISO, 2006; OCDE, 2009; USEPA, 2009, 2015; ASTM, 2019). Elle a fait l'objet d'une attention disproportionnée en raison des connaissances généralisées et de sa facilité d'élevage en laboratoire à tout moment de l'année. Le développement, la croissance et la biologie de *X. laevis* dans des conditions de laboratoire ont été largement étudiés et sont bien documentés. Cependant, comme le décrit le § 1.1, la pertinence de cette espèce pour les environnements canadiens est faible puisqu'elle appartient au milieu aquatique et qu'elle est originaire du sud de l'Afrique. En outre, la sensibilité peut varier considérablement d'une espèce d'amphibien à l'autre et, par conséquent, les essais effectués sur *X. laevis* ne nous apprennent pas grand-chose sur les effets des substances chimiques sur les grenouilles d'Amérique du Nord (Relyea, 2004b).

Il existe un certain nombre d'espèces *Lithobates* (anciennement *Rana*), *Bufo*, *Pseudacris* et *Hyla* dont l'aire de répartition naturelle comprend le Canada et qui sont couramment utilisées dans les essais de toxicité. Il s'agit notamment de *Lithobates pipiens*, *Lithobates sylvaticus*, *Lithobates clamitans*, *Lithobates septentrionalis*, *Lithobates catesbeiana*, *Lithobates palustris*, *Bufo boreas*, *Bufo americanus*, *Pseudacris crucifer*, *Pseudacris regilla*, *Hyla versicolor*, et *Hyla chrysoscelis*. L'anoure canadien indigène le plus souvent étudié est *L. pipiens* (Edginton, 2001).

Des travaux approfondis sur les amphibiens ont été réalisés dans deux laboratoires d'Environnement et Changement climatique Canada. Les recherches menées dans les installations du Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon (LEEPY) ont principalement porté sur les ouaouarons (*Lithobates catesbeiana*), tandis que le LEEA a étudié les grenouilles léopards (*Lithobates pipiens*) et les grenouilles des bois (*Lithobates sylvaticus*). Les études menées au LEEPY, en collaboration avec l'Université de Victoria, ont porté sur les effets des expositions aiguës ou chroniques à l'atrazine (Gunderson *et al.*, 2011), à l'ibuprofène (Veldhoen *et al.*, 2014), aux nanométaux (Hinther *et al.*, 2010b), au triclosan (Veldhoen *et al.*, 2006), aux hormones thyroïdiennes, à l'œstradiol et aux effluents d'eaux usées municipales (Heerema *et al.*, 2018; Jackman *et al.*, 2018) concernant l'espèce *L. catesbeiana*. Les effets de ces substances sur les systèmes thyroïdien ou olfactif des amphibiens ont été évalués à l'aide de paramètres classiques et de l'expression génétique. Dans une autre étude, l'essai de métamorphose des amphibiens (v. OCDE, 2009) a été adapté à la rainette du Pacifique (*Pseudacris regilla*), et les changements dans l'expression génétique ont été comparés aux paramètres morphologiques (Marlatt *et al.*, 2013). Des études menées au LEEA, en collaboration avec l'Université d'Ottawa, ont évalué les effets des expositions chroniques ou par pulsations aux herbicides à base de glyphosate sur les grenouilles des bois (*Lithobates sylvaticus*; Lanctôt *et al.*, 2014; Navarro-Martín *et al.*, 2014). Comme il est mentionné dans le § 1.3.1, le LEEA a évalué la toxicité aiguë de divers pesticides pour les têtards de *L. pipiens*, *L. sylvaticus* et *L. catesbeiana* ainsi que pour des espèces non amphibiennes sur une période d'étude de douze ans (Doe *et al.*, 2012). Le LEEA a également contribué à l'élaboration d'un protocole d'hibernation artificielle et de reproduction publié pour *Lithobates pipiens* (Trudeau *et al.*, 2010), qui a été affiné tout au long de l'élaboration de cette méthode d'essai (LEEA, 2004, 2006, 2009, 2013, 2018; v. annexe F). Le LEEA a mis en place de nombreuses pratiques d'élevage d'amphibiens et modes opératoires figurant dans les méthodes d'essai depuis 2002, notamment : l'optimisation de l'élevage, du maintien, de la source de nourriture, de la densité de chargement et des conditions d'essai de toxicité chronique pour les différents stades de développement; la prévention et le traitement des

maladies; l'évaluation des effets de la qualité de l'eau (p. ex. *dureté*, ammoniac); l'évaluation de toxiques de référence potentiels; la fourniture d'organismes d'essai pour trois séries d'études interlaboratoires et la participation à ces dernières (LEEA, 2004, 2006, 2009, 2013, 2015, 2016a, 2016b, 2018; P. Jackman, Environnement Canada, Moncton [Nouveau-Brunswick], communication personnelle, 2007; Nautilus Environmental, 2020a, 2020b).

Section 2

Organismes d'essai

2.1 Espèces et stade de leur développement

Cette méthode biologique doit être appliquée en utilisant *Lithobates pipiens* (anciennement *Rana pipiens*; Schreber, 1782) pour chacune des deux options d'essai (essai de 14 jours ou de 42 jours) décrites ici (v. § 1.1 et 4.3.1)⁵.

L'identification, le cycle de vie et la répartition de *L. pipiens*, communément appelée grenouille léopard, sont résumés au § 1.2. Des personnes compétentes (c.-à-d. un taxonomiste), expérimentées dans l'identification des espèces d'anoures, doivent procéder à la confirmation et à la documentation⁶ des espèces pour chaque lot d'organismes à utiliser pour l'élevage ou les essais, reçus d'un fournisseur ou prélevés dans la nature. L'identification des espèces peut être faite par l'intermédiaire des caractéristiques taxonomiques distinctives qui sont décrites et illustrées dans les clés taxonomiques, ou par l'intermédiaire de l'identification taxonomique fondée sur le code à barres de l'ADN (v. § 1.2)⁷. 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 taxonomique ou le nom du ou des taxonomistes consultés. Après avoir obtenu du fournisseur l'identification taxonomique de l'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 reçu de ce même fournisseur. Toute l'information

⁵ Bien que cette méthode d'essai puisse être utilisée pour analyser d'autres espèces d'anoures (v. § 4.6.3), seul *L. pipiens* a été validé pour être utilisé avec cette méthode d'essai biologique (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b).

⁶ Pour être acceptable, l'identification des spécimens de laboratoire doit être effectuée par un taxonomiste qualifié ou par analyse moléculaire (code à barres de l'ADN).

⁷ Il est possible d'utiliser des méthodes moléculaires pour vérifier les espèces (Hoffman et Blouin, 2004; Wilson *et al.*, 2008); cependant, on ne sait pas si ces méthodes sont disponibles dans les laboratoires commerciaux et le codage à barres de l'ADN n'est peut-être pas facilement accessible.

nécessaire à l'identification adéquate des organismes expédiés à un laboratoire d'essai doit accompagner chaque envoi. Les documents relatifs à chaque lot d'organismes achetés auprès d'un fournisseur de matériel biologique ou d'un autre laboratoire doivent inclure, à tout le moins, le nombre estimé 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 (c.-à-d. l'apparence, la mortalité, la température, l'oxygène dissous et le pH si les organismes ont été expédiés dans de l'eau) et l'identification des espèces. Pour les organismes collectés sur le terrain, les registres doivent également indiquer la date et l'heure de la collecte et le lieu, et devraient indiquer les conditions du site de collecte.

Différentes variantes ou unités désignables (UD; v. § 1.2) d'une même espèce pourraient avoir des sensibilités différentes, bien que cela n'ait pas été étudié. Pour une plus grande normalisation, le même groupe génétique devrait être utilisé au fil du temps au sein du laboratoire^{8,9}.

⁸ La taxonomie de *L. pipiens* est compliquée étant donné l'existence de variantes distinctes ou d'unités désignables au Canada et aux États-Unis. Cette situation peut être compliquée par la différenciation génétique potentielle entre des populations locales séparées par de courtes distances (≥ 45 km) (Wilson *et al.*, 2008). La conservation des populations locales constitue une autre considération dans le cas des organismes collectés sur le terrain. La collecte excessive de populations sauvages à partir de sources locales pourrait épuiser les populations distinctes. En outre, il peut être difficile d'acquérir des organismes d'essai représentant la variante de l'Ouest en raison de leur situation quant à la conservation (v. § 1.2). Lors de l'achat de *L. pipiens* auprès de fournisseurs américains, il faudrait veiller tout particulièrement à ce que les organismes d'essai soient bien *L. pipiens*, et obtenir, si possible, des renseignements sur la variante à laquelle ils appartiennent (celle de l'Est ou de l'Ouest).

⁹ Cette méthode a été mise au point en utilisant des organismes d'essai provenant des populations de l'Est et de l'Ouest de *L. pipiens*.

L'essai de toxicité décrit ici doit être entamé en utilisant des *larves* (c.-à-d. des *têtards*) au stade 25 de Gosner pour l'essai de 14 jours et aux stades 28 à 29 de Gosner (ci-après appelés 28/29) pour l'essai de 42 jours (v. § 2.3.8). Les différents stades de développement au début de la vie des grenouilles sont importants et font partie intégrante de l'option d'essai à choisir. La première option d'essai est un essai de 14 jours. Cette option d'essai plus courte démarre avec des têtards qui commencent à se nourrir (SG 25) et couvre le début du développement des bourgeons des membres postérieurs (SG 26-29). Ces premiers stades de développement comprennent également une période de croissance générale des larves¹⁰. L'essai de 14 jours est particulièrement utile pour mesurer les effets sur la croissance; toutefois, il n'englobe qu'une partie relativement courte du stade de développement aquatique de *L. pipiens*. La deuxième option d'essai est un essai de 42 jours. Cette option d'essai plus longue commence par des têtards au SG 28/29 (présentant des bourgeons de membres postérieurs développés) et couvre les stades de différenciation et de développement des orteils (SG 31-40)¹¹. Cet essai

¹⁰ Lors de la première phase de l'étude de validation interlaboratoire d'Environnement et Changement climatique Canada impliquant quatre laboratoires participants, le stade de Gosner moyen chez les organismes témoins à la fin d'une exposition de 14 jours variait de 27,3 à 29. En outre, le poids humide des têtards témoins a augmenté de manière significative (c.-à-d. de 7 à 10 fois) au cours de l'exposition de 14 jours. La longueur totale du corps et la longueur du museau-cloaque ont également augmenté, mais de façon moins importante, avec des augmentations de 24 à 50 % pour la longueur totale et de 4 à 33 % pour la longueur du museau-cloaque dans les quatre laboratoires participants (Nautilus Environmental, 2020a).

¹¹ Lors du troisième cycle de l'étude de validation de la méthode interlaboratoire d'Environnement et Changement climatique Canada impliquant trois laboratoires participants, le stade de Gosner moyen chez les organismes témoins à la fin d'une exposition de 42 jours variait de 35 à 41. Dans deux laboratoires, 10 % et 37 % des têtards témoins, respectivement, ont atteint le stade 42 de Gosner (marqué par l'apparition des membres antérieurs). Bien qu'une croissance ait été observée au cours de l'exposition de 42 jours, elle n'était pas aussi prononcée que celle observée au cours de l'essai de 14 jours réalisé au cours de la première phase de l'essai interlaboratoire. Ces données laissent entendre que les augmentations du poids humide sont plus prononcées au

comprend une période de changements métamorphiques qui inclut la croissance et le développement des membres externes. Ces changements métamorphiques impliquent plusieurs processus endocriniens, y compris, sans toutefois s'y limiter, les systèmes hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (HPT) et hypothalamo-hypophysogonadique (HPG). L'essai de 42 jours constitue une exposition beaucoup plus longue; il est conçu pour caractériser les effets néfastes des substances chimiques sur ces systèmes et sur d'autres systèmes impliqués (directement ou indirectement) dans le processus de métamorphose. Le § 4.6.3 décrit d'autres plans d'expérience qui décrivent le début de l'essai à différents stades de développement, des essais à plus long terme (c.-à-d. un essai de 56 jours qui est essentiellement une combinaison des options d'essai de 14 et 42 jours), des essais qui se prolongent (c.-à-d. jusqu'à la métamorphose) ou l'inclusion de paramètres supplémentaires; ces essais sont de nature plus expérimentale et n'ont pas été validés en vue d'une utilisation normalisée dans le présent document de méthode d'essai.

Le développement généralisé des espèces de grenouilles anoures, de l'*œuf* à la *métamorphose*, est décrit par Gosner (1960) et illustré dans les figures 2.1 et 2.2. La classification comprend 46 stades, les 25 premiers étant fondés sur un schéma élaboré par Shumway (1940). Les œufs en santé sont noirs sur le dessus et blancs sur le dessous lorsqu'ils sont libérés, et ils sont recouverts d'une couche gélifiée. Si les œufs sont fécondés, la couleur noire se propage jusqu'à ce que les œufs soient complètement noirs. Par la suite, les œufs commencent à s'allonger et des mouvements sont observés dans la masse d'œufs. La couche gélifiée finit par se décomposer, et les embryons éclosent sous la forme de *nouveau-nés* au stade 20 environ (SG 20). Les nouveau-nés sont normalement de couleur foncée. Le SG 25 (têtards) est reconnaissable à la perte totale des branchies externes (v. fig. 2.1; l'*opercule* gauche se ferme en dernier), et c'est à ce moment-là que les têtards commencent à se nourrir. Du SG 25 au début de la métamorphose (SG 42), la période larvaire est la plus longue, et les stades sont généralement caractérisés par la croissance et le développement des membres. Le développement des membres

cours des premiers stades (c'est-à-dire de SG 25 à SG 29) du développement (Nautilus Environmental, 2020b).

postérieurs est visible du SG 26 au SG 40, tandis que les membres antérieurs se développent de manière interne (les membres antérieurs deviennent apparents sous la peau au SG 41; v. fig. 2.2), ils apparaissent soudainement et généralement de manière asynchrone (c.-à-d. qu'un membre antérieur apparaît quelques heures ou quelques jours avant le second). Le stade 42 de Gosner (SG 42) est marqué par l'apparition du deuxième membre antérieur (v. fig. 2.2). Au cours des derniers stades de la métamorphose (SG 43-46), les organismes subissent une réabsorption de la queue et une augmentation de la taille de la bouche; les structures permettant aux larves de s'alimenter sont alors remplacées par les mâchoires et la langue des adultes (v. fig. 2.2). Les membres antérieurs et postérieurs deviennent également fonctionnels (McDiarmid et Altig, 1999). Les essais décrits ici sont conçus pour déterminer les effets sur *L. pipiens* à différents stades de développement, depuis le début de l'alimentation des têtards (SG 25) jusqu'au développement des membres et à la différenciation des orteils, en fonction de l'option d'essai choisie (v. § 4.3.1). Pour aider le personnel du laboratoire à planifier le début des deux options d'essai, on a calculé la durée approximative de développement jusqu'au SG 30 à la température d'essai (tableau 1).

2.2 Sources

Les organismes d'élevage pour les essais peuvent être achetés sous forme d'embryons ou de larves. On peut également se procurer des adultes matures et gravides pour un frai immédiat ou pour une hibernation et un frai futur, afin de fournir des organismes d'essai. Les embryons, les larves ou les adultes de *L. pipiens* peuvent être obtenus auprès d'un fournisseur de matériel biologique commercial ou de laboratoires gouvernementaux ou privés connus afin de s'assurer que les stocks sont exempts de maladies. L'option la moins souhaitable consiste à prélever les embryons ou adultes de *L. pipiens* sur le terrain, de cette manière une identification minutieuse est nécessaire pour distinguer cette espèce des espèces semblables (v. § 1.2)¹². En outre,

¹² Comme il peut être difficile de distinguer les œufs de *L. pipiens* des espèces d'anoures apparentées, les collecteurs devraient être bien formés en matière d'habitats et d'identification des espèces (ASTM, 2013). Les personnes qui collectent les organismes d'essai doivent respecter tous les règlements fédéraux,

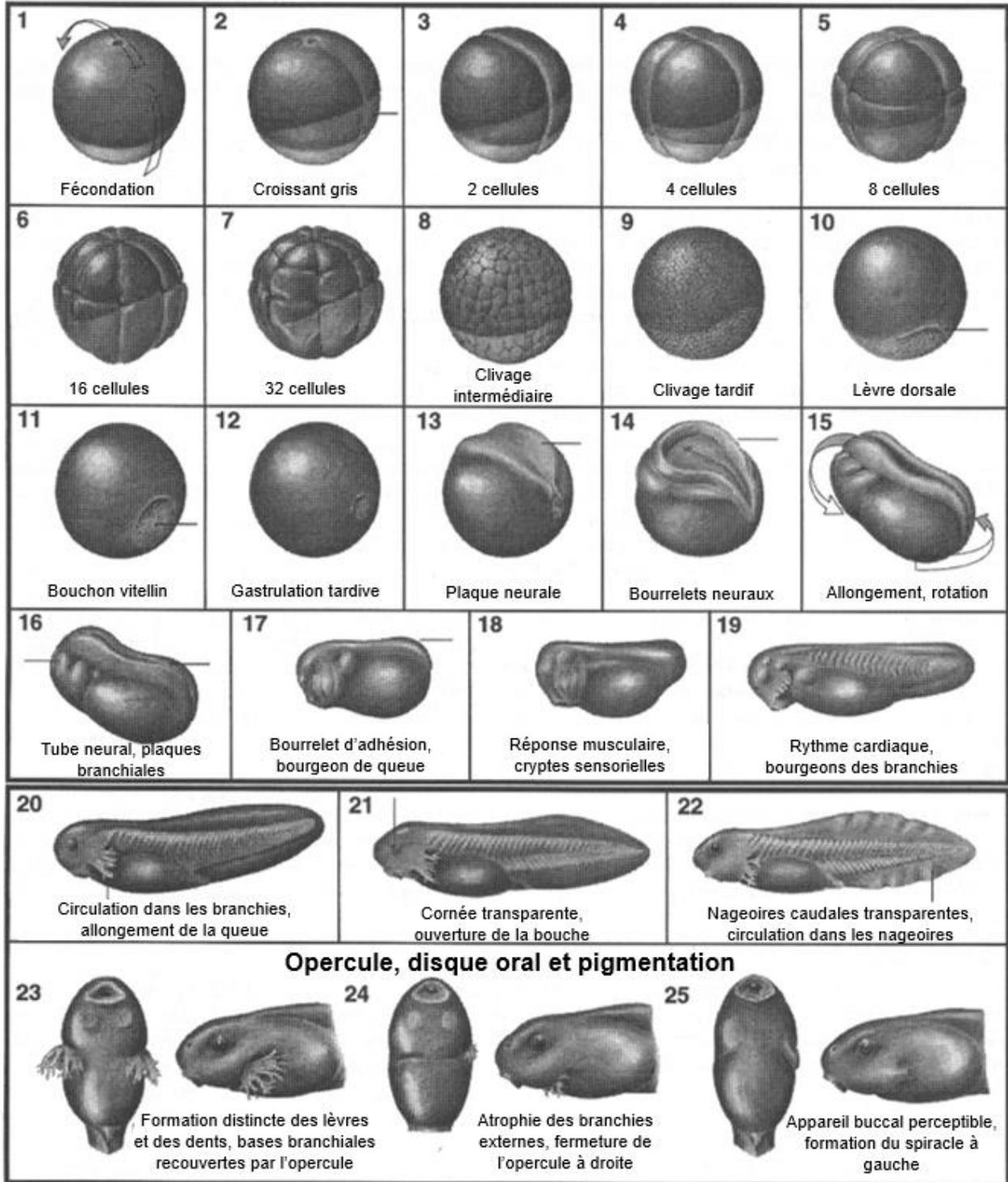
la diversité génétique des différentes sources de *L. pipiens* (p. ex. variantes de l'Est et de l'Ouest, diversité des populations locales) devrait être prise en considération lors de l'obtention d'organismes aux fins d'élevage ou d'essai (v. § 2.1). Même si les parasites et les maladies ne sont pas rares chez les embryons et les larves, ils sont plus fréquents chez les grenouilles adultes collectées dans la nature. Tous les organismes collectés sur le terrain devraient être soigneusement examinés, mis en quarantaine et soumis à une période d'acclimatation si nécessaire avant d'être utilisés dans les essais ou avant de fournir des organismes d'essai pour les essais. Il faudrait déterminer que tout site sur lequel sont prélevés des organismes est propre et exempt de toute source de contamination chimique au cours des cinq dernières années ou plus.

Les organismes d'essai élevés en laboratoire sont préférables pour un certain nombre de raisons, notamment parce que leur taxonomie est connue, qu'ils sont réputés exempts de maladies et que l'impact sur les populations sauvages est réduit au minimum. Cependant, le bon maintien d'une population reproductrice de grenouilles nécessite d'énormes ressources et s'avère relativement rare¹³.

provinciaux et/ou régionaux/municipaux et être en possession des permis de collecte nécessaires, le cas échéant.

¹³ L'élevage de spécimens métamorphes et le maintien à long terme de subadultes et d'adultes pour constituer une population reproductrice ont été réalisées avec succès en laboratoire par le Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique (LEEAA). Le LEEAA a été confronté à des défis importants pour maintenir une population de *L. pipiens* pendant toutes les phases de leur cycle de vie, notamment en ce qui concerne les types de nourriture et les fréquences d'alimentation, le maintien de la qualité de l'eau et la lutte contre les maladies. Plusieurs documents fournissent des conseils et des modes opératoires pour le maintien des élevages en laboratoire de *L. pipiens*, notamment : LEEAA, 2004, 2006, 2009, 2013, 2018. En outre, des conseils généraux sur l'élevage des grenouilles peuvent s'avérer utiles pour établir et maintenir des élevages de grenouilles en laboratoire (Wright et Whitaker, 2001).

EMBRYONS



NOUVEAU-NÉS

Figure 2.1 Stades de développement (SG 1 à SG 25) des embryons et des nouveau-nés d'anoures décrits par Gosner (1960). (Reproduit d'après McDiarmid et Altig, 1999, figure 2.1, avec l'autorisation de l'University of Chicago Press).

LARVES

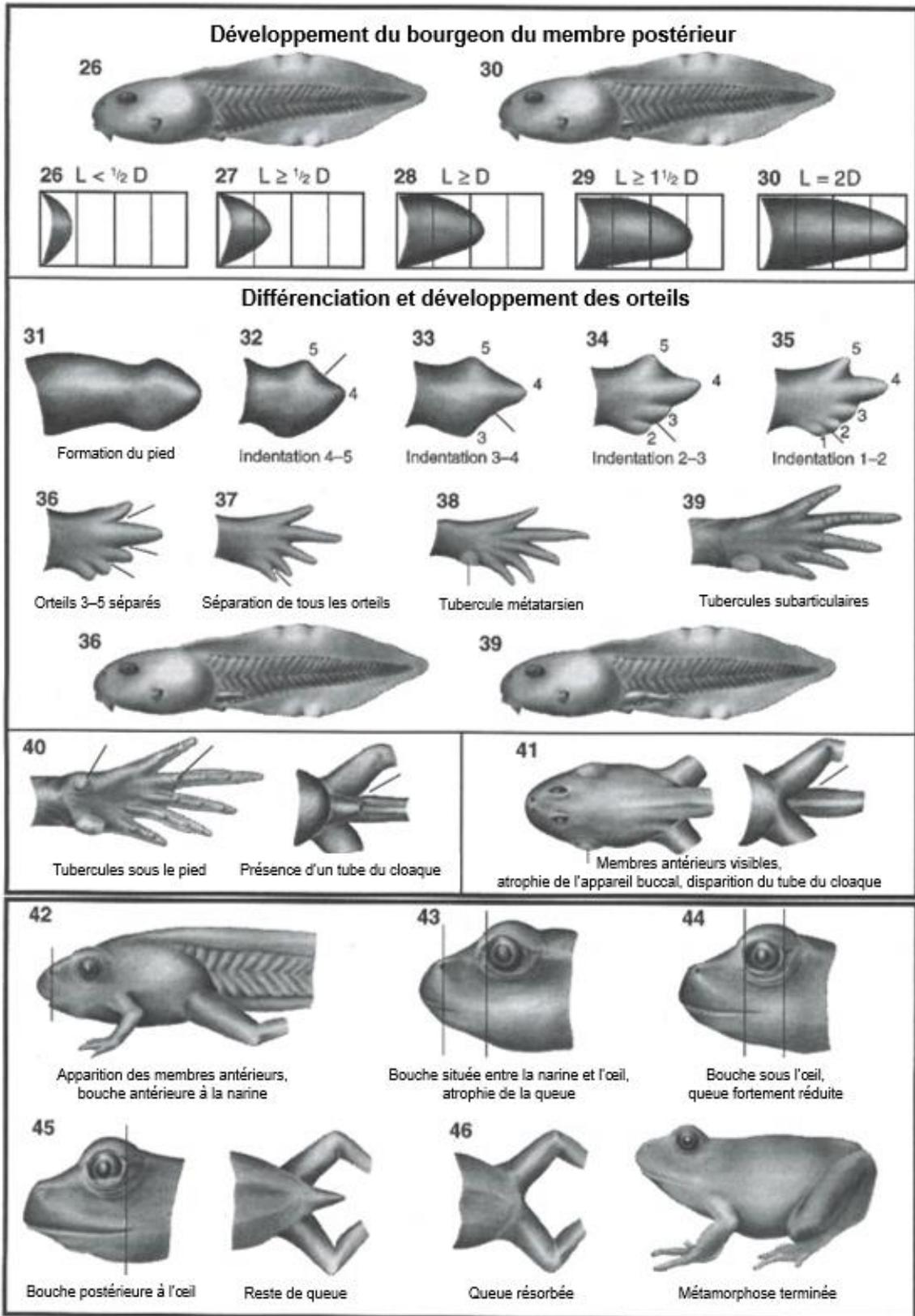


Figure 2.2 Stades de développement (SG 26 à SG 46) des larves et des spécimens métamorphes d'anoures décrits par Gosner (1960). (Reproduit d'après McDiarmid et Altig, 1999, figure 2.1, avec l'autorisation de l'University of Chicago Press).

Tableau 1. Temps approximatifs des stades de développement de *Lithobates pipiens* à la température d'essai, d'après l'ASTM (2022a) et les données extraites des études interlaboratoires (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b)¹⁴

Stade	Âge approximatif (j) à 23 ± 1 °C	Principales caractéristiques/formations pendant le stade
1	0	Avant la fécondation
9/10	1	Clivage tardif/Apparition de la lèvre dorsale du blastopore
13	2	Plaque neurale, fente de formation du blastopore
16	3	Tube neural
18	4	La forme de « têtard » devient distincte; réponse musculaire à la stimulation
19	5	Rythme cardiaque; bourgeons branchiaux externes; début de l'éclosion
20	6–7	Éclosion complète; nage sur stimulation physique; circulation capillaire de la première branchie
21	7	Bouche ouverte; cornée transparente; longueur de la queue approximativement égale à celle de la tête et du corps
22	8	Épiderme transparent; circulation capillaire dans la queue; aspect asymétrique par rapport à l'aspect dorsal; filaments branchiaux gauches plus apparents
23	8–9	Repli operculaire apparent; asymétrique par rapport à l'aspect ventral
24	9–10	Opercule recouvrant les branchies externes du côté droit; branchies externes du côté gauche encore apparentes; ventouse buccale représentée par deux petites proéminences
25	10–12	Opercule complet; pas de filaments branchiaux externes; ventouse buccale représentée par deux taches pigmentées; commence à s'alimenter; intestin clairement visible
26–30	≥ 14–21	Les bourgeons des membres postérieurs apparaissent et grossissent progressivement; spiracle présent sur le côté gauche (pour la plupart des têtards d'Amérique du Nord)

¹⁴ Le développement de *L. pipiens* progresse beaucoup plus lentement à des températures plus basses. Par exemple, au cours de la première série d'essais interlaboratoires, trois laboratoires ont maintenu les œufs/larves à 10-15 °C pendant trois à quatre semaines pour retarder le développement avant de commencer un essai avec des têtards au SG 25; cette méthode s'est avérée fructueuse et on n'a observé aucune augmentation de la mortalité ou du stress, à l'exception d'un laboratoire qui a connu une panne du refroidisseur (Nautilus Environmental, 2020a). En outre, au cours de la troisième série d'essais interlaboratoires, deux laboratoires ont maintenu les masses d'œufs à 15-16 °C pendant 28 ou 35 jours pour retarder l'éclosion (Nautilus Environmental, 2020b).

Les sources commerciales de *L. pipiens* comprennent notamment¹⁵ :

Boreal Science (fournisseur canadien de la nourriture pour têtards Ward's®)
399, chemin Vansickle
St. Catharines (Ontario)
L2S 3T4 Canada
Téléphone : 1-800-387-9393
Télécopieur : 1-800-668-9106
Site Web : www.boreal.com/store/
Courriel : borealcs@vwr.com
Stade de développement : adultes : (disponible de septembre à juillet)

Carolina Biological Supply Company
Département des ventes internationales
C.P. 6010
Burlington, C.N. 27216-6010
États-Unis
Téléphone : 1-336-586-4399
Site Web : www.carolina.com/
Courriel : internationalsales@carolina.com
Stade de développement :
embryons : (disponible de janvier à juin)
adultes : (disponible d'octobre à juin)

Pour des renseignements à jour sur les fournisseurs de *L. pipiens*, communiquez avec la ressource suivante :

Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et Changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario) K1A 0H3
Courriel : methods@ec.gc.ca

Tous les têtards utilisés dans un essai de toxicité doivent provenir du même *lot* et de la même source. Les embryons ou les larves provenant de fournisseurs commerciaux ou collectés dans la nature devraient être manipulés le moins possible (v. § 2.3.7)¹⁶. Les fournisseurs emballent et

¹⁵ La liste des fournisseurs commerciaux était à jour à la date de publication de cette méthode.

¹⁶ Le succès de l'éclosion est plus élevé si la manipulation des œufs est réduite au minimum (ASTM, 2022a).

expédient généralement les embryons ou les larves dans des sacs scellés remplis d'eau ou dans d'autres contenants auxquels on a injecté de l'oxygène (les niveaux d'oxygène dissous devraient être maintenus au-dessus de 4 mg/L pour éviter de stresser les organismes d'essai). Dès leur réception, on doit consigner la température et l'aspect des organismes (v. § 2.3.9). En outre, on devrait mesurer et consigner l'oxygène dissous et le pH de l'eau d'expédition et de l'eau du réservoir dans lequel ils seront placés. On peut transférer les embryons ou les larves dans des réservoirs de maintien légèrement aérés (v. § 2.3.2), et on devrait ajuster graduellement la température de l'eau (p. ex. ≤ 3 °C par jour) pour l'amener à la température à utiliser pendant l'élevage (v. § 2.3.4) ou à la température à utiliser pour les essais (v. § 4.3.3). Pour réduire au minimum l'impact des changements soudains dans la composition chimique de l'eau, l'eau d'expédition et l'eau de laboratoire devraient être mélangées de manière progressive (Bradfield, 2010; ASTM, 2022a)¹⁷. Les masses d'œufs peuvent être séparées en petites sections en coupant le filament qui les lie à l'aide d'un scalpel ou de ciseaux, si nécessaire. Il faut s'assurer de maintenir les embryons sous l'eau pendant toute manipulation. Il faudrait suivre les conseils donnés sur la manipulation des embryons et des larves de *L. pipiens* dans le § 2.3.7 et lors du transfert d'organismes d'une source externe aux récipients de conservation (§ 2.3.2). Les autres conditions existantes pendant cette période transitoire pour l'*acclimatation* des embryons et des larves aux conditions du laboratoire devraient être aussi semblables que possible à celles que l'on emploie pour maintenir les organismes d'essai (§ 2.3).

Les grenouilles adultes achetées ou collectées pour fournir des organismes d'essai devraient être envoyées au laboratoire dans une glacière tapissée de mousse humide pour éviter que les grenouilles ne se dessèchent pendant le transport. La glacière devrait être percée de trous pour permettre la circulation de l'air. Plusieurs grenouilles peuvent être placées dans une taie d'oreiller légèrement ficelée, qui sert à empêcher les grenouilles de sauter et de se blesser, puis placées sur la mousse. Les

¹⁷ Il convient de noter que des variations importantes du pH peuvent se produire lorsque les sacs d'expédition sont ouverts et subissent un dégazage (Bradfield, 2010).

mâles en phase de reproduction devraient être séparés des femelles gravides (p. ex. à l'aide de taies d'oreiller) pendant le transport. Les récipients utilisés pour l'expédition et le transport devraient être isolés afin de réduire au minimum les fluctuations de température tout au long de la transportation. Selon la période de l'année à laquelle les grenouilles ont été collectées ou sont expédiées, on peut placer des blocs chauffants ou réfrigérants sous la mousse¹⁸. On devrait transporter rapidement les organismes vivants pour s'assurer de leur livraison rapide (c.-à-d. dans les 24 h). On devrait éviter une densité excessive d'animaux pendant le transport ou l'expédition, pour les stresser le moins possible.

Les grenouilles adultes peuvent être collectées au printemps avant le frai (c.-à-d. pendant la migration vers les étangs de frai) et maintenues brièvement en laboratoire avant les injections d'hormones et la reproduction en vue d'une reproduction en cours de saison. Il est également possible de collecter des grenouilles adultes à l'automne (lors des migrations automnales vers les étangs d'hivernation) ou en hiver dans divers gîtes d'hivernage (Fred Schueler, Bishop Mills Natural History Centre, Bishops Mills [Ontario], communication personnelle, 2015), de les faire hiberner artificiellement en laboratoire, puis de leur injecter un mélange d'hormones neurotransmetteurs pour induire le frai en vue d'une reproduction hors saison (v. § 2.4.3 et annexe F). À l'arrivée au laboratoire, on devrait maintenir le lot de grenouilles adultes à l'écart de toute population existante du laboratoire afin de déterminer l'état de santé général des grenouilles. Il peut être nécessaire de maintenir les *L. pipiens* adultes en quarantaine avant de les utiliser pour obtenir des œufs, et de traiter les grenouilles adultes si des maladies sont présentes ou suspectées (v. § 2.4.4 et annexe E). Le § 2.4 et les annexes E et F fournissent des orientations supplémentaires sur le maintien, la manipulation, l'hivernation, la reproduction et la mise en quarantaine des grenouilles adultes.

Le transfert d'animaux d'un milieu à un autre soulève d'importants problèmes liés à l'introduction d'espèces non indigènes, de maladies et de parasites.

¹⁸ Un thermomètre max-min peut être inclus dans tout envoi d'organismes vivants pour confirmer que les températures appropriées ont été maintenues pendant le transport.

Tout projet d'achat, d'expédition ou de transfert de grenouilles, de larves, d'embryons ou d'œufs doit être approuvé, si les autorités régionales, provinciales ou fédérales l'exigent. Dans le cas des grenouilles achetées aux États-Unis, les procédures de l'Association du transport aérien international (IATA) doivent être respectées pour l'expédition par avion. Les gouvernements provinciaux (généralement le ministère des Richesses naturelles, par exemple le Comité des introductions et des transferts de l'Ontario) peuvent exiger un permis pour collecter ou importer des amphibiens ou leurs embryons, que l'espèce soit indigène ou non dans la région. Par ailleurs, les déplacements ou la collecte d'espèces d'amphibiens pourraient être contrôlés par un comité fédéral-provincial des introductions et transplantations d'espèces. Une demande de permis auprès de l'agence provinciale ou fédérale compétente peut être nécessaire, en fonction des procédures en vigueur à l'échelle locale. Un laboratoire pourrait être tenu de fournir la preuve d'une inspection vétérinaire des amphibiens par le collecteur ou le fournisseur avant d'obtenir un permis. Pour plus de renseignements sur les éventuelles exigences en matière de permis d'Environnement et Changement climatique Canada, veuillez communiquer avec le centre de renseignements : enviroinfo@ec.gc.ca.

Les laboratoires peuvent être tenus de créer et d'utiliser une aire de quarantaine dans leurs installations pour y isoler les organismes importés et pour y stériliser et éliminer, conformément aux règlements provinciaux ou fédéraux, l'équipement et les liquides entrant en contact avec les organismes.

En outre, le Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) et divers organismes provinciaux peuvent exiger des rapports annuels sur l'utilisation d'animaux vivants aux fins d'essai.

2.3 *Maintien et culture des embryons et des larves*

Cette section fournit des indications sur la conservation, l'élevage et l'acclimatation des embryons et des larves en vue de leur utilisation dans les essais de toxicité au stade de développement requis.

2.3.1 Généralités

Les conditions recommandées et requises pour l'élevage, la conservation et l'acclimatation des embryons et des larves de *Lithobates pipiens*, résumées dans le tableau 2, sont destinées à permettre une certaine souplesse au sein d'un laboratoire. Bien que des orientations et des recommandations soient fournies dans le présent document, des instructions explicites concernant de nombreux aspects de la conservation et de l'élevage, notamment le choix des récipients de conservation, le nombre d'organismes par récipient et les conditions de renouvellement de l'eau, sont laissées à la discrétion et à l'expérience du personnel de laboratoire. Une grande partie du § 2.3 découle des modes opératoires établis dans le cadre de recherches menées par des laboratoires canadiens; toutefois, des modes opératoires généraux pour l'élevage des amphibiens (v. les références à l'annexe E) peuvent être consultés et suivis si des détails supplémentaires sont nécessaires. En outre, il est recommandé aux techniciens de laboratoire de manipuler tous les organismes conformément aux lignes directrices du CCPA (2021) pour les amphibiens, et/ou conformément aux instructions des vétérinaires et des Comités de protection des animaux, le cas échéant. Une manipulation et des soins appropriés concernant les amphibiens sont essentiels pour la partie « raffinement » des trois R (v. § 4.9).

Lors de la mise en place initiale des essais de toxicité avec *L. pipiens*, des *essais préliminaires* (généralement, des essais utilisant un toxique de référence, et/ou des essais utilisant de l'*eau témoin/dilution*; v. § 3.3.1) peuvent être effectués par le laboratoire avant tout essai de toxicité *définitif*. Les résultats de ces essais peuvent être utilisés pour démontrer la capacité du laboratoire à respecter les critères de validité des essais et à obtenir des résultats de toxicité uniformes. Les résultats peuvent également servir à établir les concentrations du toxique de référence à utiliser comme *concentration témoin positive* parallèlement aux essais *définitifs* de toxicité (v. § 4.8.2).

On utilise des indices¹⁹ fondés sur le rendement pour évaluer la qualité des organismes d'essai et

¹⁹ Ces indices se fondent notamment sur la survie et l'état des organismes d'élevage qui sont destinés à servir dans l'essai (v. § 2.3.8); il s'agit également des critères à

l'acceptabilité des résultats des essais. Les organismes conservés pour être utilisés dans l'essai doivent avoir de faibles taux de mortalité acceptables (v. § 2.3.8). En plus de paraître en santé, les organismes doivent se comporter et s'alimenter normalement (v. § 2.3.8). Le § 2.3.9 fournit des indications sur le suivi de la santé des organismes d'essai avant et après l'éclosion. En outre, les organismes *témoins* doivent avoir des taux de mortalité faibles acceptables et satisfaire à tous les critères de validité d'un essai de toxicité (v. § 2.3.9 et 4.7). L'acceptabilité de l'*élevage* doit également être démontrée par le rendement des individus du lot d'organismes d'essai utilisés pour démarrer un essai de toxicité à une ou plusieurs concentrations du *toxique de référence* connu pour avoir un effet néfaste sur les organismes d'essai (c.-à-d. un témoin positif effectué en même temps que l'essai, ou un *essai de toxicité de référence* à plusieurs concentrations; v. § 2.3.9 et 4.8). Si on le souhaite, une partie du lot d'organismes peut être maintenue à une température réduite (p. ex. de 10 à 15 °C) pour retarder le développement et fournir des organismes qui seront utilisés ultérieurement pour les essais (v. § 2.3.4 et note de bas de page 12). Si un lot ne satisfait pas à ces critères fondés sur le rendement, il faudrait rechercher les causes de cette situation.

Le tableau 2 qui suit présente une liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour l'élevage, la conservation et l'acclimatation de *L. pipiens* afin de produire des organismes au stade de développement requis pour l'utilisation dans les essais de toxicité. Le § 2.4 et les annexes E et F fournissent de plus amples détails sur les modes opératoires de maintien, d'hibernation et d'injection des grenouilles adultes afin d'obtenir les *gamètes* pour la production des organismes d'essai.

2.3.2 Équipement et appareillage

Il faut maintenir les embryons et les larves dans une installation de laboratoire à température contrôlée. L'équipement de maintien de la température (incubateur ou pièce à température constante) doit permettre de conserver la température entre les valeurs recommandées (§ 2.3.4). Le secteur des élevages devrait être isolé de celui des essais, de

respecter par les organismes témoins pour que l'essai soit valide (v. § 4.7) ainsi que des critères reliés aux performances de groupes d'animaux dans des essais toxicologiques de référence (v. § 4.8).

l'entreposage ou de préparation des échantillons pour éviter la contamination croisée. Il doit être conçu et construit de façon à prévenir la contamination des élevages (p. ex. suppression des tuyaux, garnitures ou accessoires de cuivre ou galvanisés qui pourraient laisser dégoutter des condensats contaminés par des métaux).

Dans l'élevage, tout l'équipement, tous les récipients et tous les accessoires qui pourraient entrer en contact avec les organismes doivent être propres, rincés convenablement et fabriqués de matériaux non toxiques (p. ex. verre, Téflon^{MC}, acier inoxydable 316, nylon, Nalgène^{MC}, porcelaine, polyéthylène, polypropylène). Les matières toxiques, notamment le cuivre, le zinc, le laiton, le métal galvanisé, le plomb et le caoutchouc naturel, ne doivent pas entrer en contact avec cet appareillage et équipement ni avec l'eau d'élevage.

Les embryons et les larves peuvent être incubés et cultivés dans des aquariums, des bacs ou des réservoirs constitués de matériaux non toxiques tels que ceux énumérés précédemment²⁰. La profondeur de l'eau doit être suffisante pour que les masses d'œufs restent entièrement immergées et que les larves puissent se déplacer verticalement (p. ex. 20 cm ou plus). Les substrats ne sont ni nécessaires ni recommandés. Le chargement ou la densité de peuplement des embryons ou des larves dans chaque récipient de maintien et d'élevage doivent être consignés et il faudrait les limiter pour prévenir une densité excessive ainsi que ses effets indésirables sur la croissance et la santé de l'organisme (Gromko *et*

al., 1973; Newman, 1986; Denver, 1997; Glennemeier et Denver, 2002). Le chargement recommandé pour les récipients de maintien et d'élevage sont de 1 masse d'œufs pour 17 à 20 L, pas plus d'environ 6 organismes/L pour les éclosions jusqu'au SG 25, et pas plus d'environ 3 organismes/L pour les têtards \geq SG 25.

Les embryons et les larves conservés au laboratoire devraient être observés fréquemment (c.-à-d. au moins trois fois par semaine, de préférence tous les jours). Dans l'idéal, il faudrait tenir des registres pour documenter les détails du maintien des animaux et les observations sur leur santé (v. § 2.3.7, 2.3.8 et 2.3.9). La mortalité par les nouveau-nés et les têtards doit être consignée (de préférence quotidiennement) et les organismes d'essai morts doivent être retirés lorsqu'ils sont observés. Les réservoirs sont remplis d'eau d'élevage (§ 2.3.5) et devraient être équipés d'un système de contrôle de la température et d'aération. Les réservoirs peuvent également être équipés d'un dispositif de contrôle de l'ammoniac²¹.

Le choix de la taille et du nombre de récipients de maintien et d'élevage requis pour les embryons et les larves de *L. pipiens* pourrait être influencé par le nombre d'organismes conservés au laboratoire et le nombre d'organismes d'essai requis par l'installation d'essai pour une ou plusieurs séries d'essais de toxicité. Des récipients de maintien et d'élevage supplémentaires devraient être installés si nécessaire pour maintenir les densités de chargement recommandées.

²⁰ Les réservoirs destinés à l'élevage des têtards devraient offrir une grande surface pour l'échange de gaz et l'aération.

²¹ Si les têtards sont maintenus plus longtemps, une plateforme doit être ajoutée au réservoir ou celui-ci doit être incliné lorsqu'ils atteignent le stade 42 de Gosner (c.-à-d. apparition des pattes avant; v. § 2.1) pour permettre aux grenouilles nouvellement métamorphosées de sortir de l'eau et d'éviter de se noyer. Par ailleurs, les spécimens métamorphes devraient être transférés dans des réservoirs avec un habitat mixte terrestre et aquatique tel qu'il est décrit pour les grenouilles adultes (v. § 2.4.2).

Tableau 2. Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés et exigés pour l'élevage des embryons et des larves de *Lithobates pipiens* destinés à servir dans des essais de toxicité aquatique

Origine des <i>Lithobates pipiens</i>	<ul style="list-style-type: none"> – Organismes d'essai exempts de maladie (embryons/larves) provenant de fournisseurs de matériel biologique, d'un autre laboratoire ou d'une collecte sur le terrain (embryons uniquement); ils doivent être identifiés avec certitude jusqu'à l'espèce; toute l'information nécessaire à l'identification adéquate des organismes collectés ou expédiés à un laboratoire d'essai doit être obtenue pour chaque lot ou envoi et doit inclure, à tout le moins : <ul style="list-style-type: none"> ○ Pour les organismes achetés auprès d'un fournisseur de matériel biologique ou d'un autre laboratoire : la quantité et l'origine des embryons ou des larves de chaque envoi; le nom du fournisseur; la date de l'envoi; la date d'arrivée au laboratoire d'essai; l'état à l'arrivée; l'identification des espèces. ○ Pour les organismes prélevés sur le terrain : la date et l'heure du prélèvement; le lieu; le nombre approximatif d'embryons prélevés; les conditions sur le site de prélèvement; la date de l'envoi; la date d'arrivée au laboratoire d'essai; l'état à l'arrivée; l'identification des espèces.
Disponibilité saisonnière de <i>Lithobates pipiens</i>	<ul style="list-style-type: none"> – Pour les fournisseurs commerciaux : de janvier à juin (embryons); pour les animaux féraux : d'avril à juin, généralement de la mi-avril à la mi-mai, mais jusqu'en juin dans les régions plus au nord.
Acclimatation	<ul style="list-style-type: none"> – Température, oxygène dissous et pH de l'eau dans laquelle les organismes ont été expédiés et aspect des embryons/larves consignés à l'arrivée; transfert en douceur dans des réservoirs de maintien et acclimatation progressive jusqu'à la température de maintien ou d'essai (≤ 3 °C/jour).
Réservoirs de maintien et conditions	<ul style="list-style-type: none"> – Embryons : aquariums, réservoirs ou bacs avec une profondeur d'eau appropriée; pas de substrat; 1 masse d'œufs pour 17 à 20 L; la densité de chargement est consignée. – Larves : aquariums, réservoirs ou bacs avec une profondeur d'eau appropriée; pas de substrat; ≤ 6 têtards/L environ pour $< SG 25$; ≤ 3 têtards/L environ pour $\geq SG 25$; la densité de chargement est consignée.
Provenance de l'eau	<ul style="list-style-type: none"> – Eau souterraine non contaminée, eau de surface, eau municipale déchlorée ou sans chloramine; l'eau de surface, si elle est utilisée, est filtrée et/ou stérilisée aux rayons ultraviolets; dureté de 10 à 230 mg/L sous forme de $CaCO_3$.
Renouvellement de l'eau	<ul style="list-style-type: none"> – Renouvellement intermittent ou continu; pour le renouvellement intermittent : renouvellement à 50 % ≥ 3 fois par semaine, les organismes restent immergés pendant les renouvellements; les réservoirs sont régulièrement siphonnés pour éliminer les débris.
Qualité de l'eau	<ul style="list-style-type: none"> – Température mesurée quotidiennement; oxygène dissous et pH de chaque réservoir mesurés régulièrement (p. ex. trois fois par semaine, ou avant et après le renouvellement de l'eau); l'ammoniac (valeur cible $\leq 0,2$ mg/L d'ammoniac non ionisé), les nitrites (valeur cible ≤ 1 mg/L de nitrites), la conductivité et le chlore résiduel total (si de l'eau municipale déchlorée ou sans chloramine est utilisée) sont mesurés régulièrement (p. ex. chaque semaine ou plus fréquemment); la dureté, l'alcalinité, le carbone organique total (COT), les solides en suspension, les gaz dissous totaux, les nitrates, les métaux et les pesticides mesurés si nécessaire pour documenter la qualité de l'eau; le débit de chaque réservoir de maintien est contrôlé, de préférence chaque jour, si l'on utilise un système à renouvellement continu.
Température	<ul style="list-style-type: none"> – Température de l'eau journalière moyenne de 20 ± 2 °C et température instantanée de 20 ± 3 °C; les masses d'œufs fécondés peuvent être maintenues à des températures plus basses (de 10 à 15 °C) pendant 5 semaines au maximum pour ralentir le développement si les organismes ne sont pas destinés à une utilisation immédiate dans un essai; acclimatation progressive jusqu'à atteindre la température de maintien ou d'essai (≤ 3 °C/jour); les larves sont maintenues à 23 ± 2 °C pendant 24 à 36 heures au minimum avant d'être utilisées dans un essai.

Oxygène/aération	– Saturation en oxygène dissous de 80 à 100 %; maintenue par une aération douce et continue à l'aide d'air filtré et exempt d'huile.
pH	– De 6,5 à 8,5.
Éclairage	– À incandescence, fluorescent ou DEL; intensité lumineuse de 100 à 500 lux à la surface de l'eau dans le récipient de maintien; photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité; une période de transition de 15 à 30 minutes entre la lumière et l'obscurité est recommandée.
Alimentation	– Larves : les nourrir à volonté après avoir atteint le SG 25; il est recommandé de fournir un mélange 4:1 de chou fourrager cuit ou décongelé et d'aliments pour têtards séchés (p. ex. Ward's®), trois fois par semaine; les fréquences d'alimentation sont, par exemple, de 2 g de chou fourrager : 0,5 g de nourriture pour têtards pour 100 têtards au SG 25, et 3 g de chou fourrager : 0,75 g de nourriture pour 100 têtards aux stades 26-29; toutefois, la quantité est ajustée si nécessaire (c.-à-d. qu'elle est augmentée si la nourriture est entièrement consommée chaque jour et diminuée s'il reste de la nourriture après 2 jours); il est recommandé de fournir des agglomérés d'algues séchées (p. ex. des mini gaufrettes aux algues Hikari) à un taux cible de 3 % du poids corporel total de tous les têtards, une fois par semaine, en tant que quatrième distribution de nourriture.
Manipulation des organismes	– Port de gants pour la manipulation des embryons et des larves; manipulation minimale des organismes; pipettes de transfert à large diamètre ou petites cuillères en plastique pour le transfert des embryons; petite épaisseuse ou petit gobelet pour le transfert des têtards.
Stade de développement pour les essais	– Essai de 14 jours : SG 25 – Essai de 42 jours : SG 28/29
Santé de l'élevage	– Surveiller la mortalité dans les réservoirs au moins trois fois par semaine (de préférence quotidiennement); évaluer le bien-être des animaux (p. ex. comportement alimentaire et autre comportement, couleur de leur peau et apparence); taux de mortalité cumulé ≤ 10 % (de préférence ≤ 5 %) dans les cinq jours précédant l'utilisation dans un essai de toxicité (v. note de bas de page 42 au § 2.3.8); retirer les œufs morts et les têtards morts, malades ou moribonds.

Les renseignements contenus dans ce tableau ne sont qu'un résumé. Les exigences et recommandations définitives de cette méthode d'essai figurent dans le corps du présent document.

2.3.3 Éclairage

Les embryons et les têtards devraient être éclairés selon une *photopériode* quotidienne fixe de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité, sous un éclairage incandescent, fluorescent ou à diode électroluminescente (DEL) à spectre continu²².

²² Bien qu'un excès de rayons ultraviolets puisse endommager la peau et les yeux des amphibiens, des quantités raisonnables de rayonnement ultraviolet A et B peuvent être importantes pour la santé des amphibiens (c.-à-d. une production de vitamine D3 pour le métabolisme du calcium), la reproduction et l'immunité (Adkins *et al.*, 2003; Pough, 2007; Ferrie *et al.*, 2014; CCPA, 2021). L'éclairage à DEL fournit peu de rayonnement ultraviolet, voire aucun (Chang *et al.*, 2012; ASTM, 2022b), ce qui pourrait avoir un impact sur la santé des amphibiens. Cependant, il existe désormais des lampes à DEL spéciales qui émettent un rayonnement ultraviolet A et B (p. ex. les produits ZooMed), qui pourraient être utilisées si l'on a des doutes sur les niveaux appropriés de

L'intensité lumineuse adjacente à la surface de la solution devrait être de 100 à 500 lux avec une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

Une période de transition de 15 à 30 minutes entre les phases de lumière et d'obscurité est recommandée pour tous les stades de développement des grenouilles conservées en laboratoire²³.

rayonnement ultraviolet pour les amphibiens pendant l'élevage et les essais. Il convient de noter que les lampes à DEL n'ont pas été utilisées lors des études interlaboratoires.

²³ On recommande une période de transition « aube/crépuscule », car les changements brusques d'intensité lumineuse effraient et stressent les grenouilles. Il existe des systèmes de contrôle automatisés permettant de réduire ou d'augmenter l'intensité des lampes fluorescentes, mais ils sont coûteux. Une autre solution

2.3.4 Température

Les élevages d'embryons et de larves devraient être maintenus à une température de l'eau quotidienne moyenne de 20 ± 2 °C (la température instantanée devrait être de 20 ± 3 °C)²⁴. Les organismes d'essai doivent être acclimatés à 23 ± 2 °C et maintenus à cette température pendant au moins 24 à 36 heures avant d'être utilisés dans un essai²⁵. On peut conserver les masses d'œufs fécondés à des températures plus basses (p. ex. de 10 à 15 °C) pendant une période pouvant aller jusqu'à 5 semaines pour ralentir le développement si elles ne sont pas destinées à une utilisation immédiate dans un essai de toxicité (P. Jackman, Environnement et Changement climatique Canada, Moncton [Nouveau-Brunswick], communication personnelle, 2015; Nautilus Environmental, 2016, 2020a, 2020b). Lors de la préparation des organismes en vue de leur utilisation dans un essai, ces derniers doivent être acclimatés à la température de l'essai à un rythme ne dépassant pas 3 °C/jour. Les changements de

consiste à utiliser une source secondaire de lumière incandescente, régulée par une horloge et un rhéostat automatique, pour assurer la période de transition.

²⁴ La température corporelle privilégiée (TCP, définie comme la température choisie par les larves lorsqu'elles sont placées dans un gradient thermique en laboratoire) dépend en partie de la température à laquelle les têtards sont acclimatés, les températures plus élevées étant plus souvent privilégiées par les organismes acclimatés à des températures plus élevées. Pour *L. pipiens*, les têtards semblent avoir une TCP semblable à celui des adultes, et la TCP diurne ne semble pas différer de la TCP nocturne; toutefois, des différences saisonnières dans la TCP ont été observées (Ultsch *et al.*, 1999 et citations pertinentes dans ce document). L'influence de la température sur la différenciation et la croissance est significative, avec une augmentation des deux taux qui se fait parallèlement à la hausse des températures, jusqu'à ce qu'une température d'inhibition soit atteinte. Pour *L. pipiens*, cette température est de 23 °C (Smit-Gill et Berven, 1979 cités dans Ultsch *et al.*, 1999).

²⁵ Bien que le temps nécessaire aux larves d'anoures pour s'acclimater complètement à une nouvelle température n'ait pas été documenté (Ultsch *et al.*, 1999), on préconise généralement une période minimale de 24 à 36 heures pour mesurer le préférendum thermique final (c.-à-d. la température finalement choisie par les organismes, indépendamment de l'expérience thermique antérieure) (Ultsch *et al.*, 1999 et les citations pertinentes dans ce document).

température au cours de cette période d'acclimatation doivent être consignés.

2.3.5 Eau d'élevage

Les sources d'eau pour le maintien et l'élevage de *L. pipiens* peuvent être des eaux souterraines « non contaminées », des eaux de surface ou de l'eau potable municipale *déchlorée* ou *sans chloramine*²⁶. Il faudrait avoir démontré au préalable que l'approvisionnement en eau permet d'assurer de manière constante et fiable la survie, la santé et la croissance de *L. pipiens*. La surveillance et l'évaluation de variables telles que le chlore résiduel (si de l'eau municipale est utilisée), le pH, la dureté, l'alcalinité, le carbone organique total, la conductivité²⁷, les matières en suspension, l'oxygène dissous, les gaz dissous totaux, la température, l'ammoniac, les nitrites, le nitrate, les métaux et les pesticides devraient être effectuées aussi souvent que nécessaire pour documenter la qualité de l'eau. L'eau déchlorée ou sans chloramine doit être utilisée avec prudence, car sa qualité varie souvent et elle pourrait contenir des concentrations inacceptables de chlore, de chloramines, de fluorure, de perchlorate, de chlorate, de cuivre, de plomb, de zinc ou d'autres contaminants²⁸. Néanmoins, certains laboratoires

²⁶ De l'eau reconstituée peut être utilisée comme eau témoin et eau de dilution en fonction des objectifs de l'étude (v. § 5.3 et 6.3); cependant, en raison des grands volumes d'eau requis pour les essais, il est possible que cela ne soit pas pratique. Si de l'eau reconstituée doit être utilisée comme eau témoin et eau de dilution, elle devrait être introduite au début de l'élevage, c.-à-d. à la réception de la masse d'œufs au laboratoire. Les formulations pour la préparation de l'eau reconstituée n'ont pas été évaluées lors de l'élaboration de la méthode et, par conséquent, les instructions relatives à la préparation et à l'utilisation de l'eau reconstituée ne sont pas fournies.

²⁷ Si de l'eau de surface est utilisée pour le maintien, l'élevage ou les essais, il peut être particulièrement important de surveiller la conductivité en raison de sa relation avec la salinité, qui peut avoir des effets toxiques sur les embryons et les têtards d'amphibiens (p. ex. éclosion prématurée, capacité de survie réduite) (Karraker *et al.*, 2008; Haramura, 2016; S. Robinson, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa [Ontario], communication personnelle, 2023).

²⁸ Le cuivre est particulièrement toxique pour les larves d'amphibiens. Une concentration inférieure à 0,05 mg/L (Odum et Zippel, 2011) est recommandée. Les analyses de l'eau de ville déchlorée ou sans chloramine pour les

utilisent régulièrement de l'eau municipale déchlorée ou sans chloramine pour l'élevage et le maintien de *L. pipiens* et comme eau d'essai, sans éprouver de problème apparent (Nautilus Environmental 2020a, 2020b). Si de l'eau potable municipale doit être utilisée, il faut procéder efficacement à une déchloration²⁹ ou à une élimination de la chloramine³⁰ afin d'éliminer toute

concentrations de fond de fluorure, de perchlorate et de chlorate (sous-produit de la désinfection de l'eau potable) devraient également être incluses, car ces anions sont des substrats du transporteur d'iode de la glande thyroïde, et des niveaux élevés de ces anions pourraient influencer sur les résultats de la croissance et de la métamorphose (Sparling et Harvey, 2006; OCDE, 2009). Pour l'élevage de *Xenopus laevis*, l'ASTM (2019) recommande des concentrations maximales pour les métaux suivants : cadmium 10 µg/L, plomb 5 µg/L, mercure 0,144 µg/L, nickel 25 µg/L, sélénium 140 µg/L et zinc 70 µg/L. Les caractéristiques d'une eau de dilution acceptable pour les essais avec *Xenopus laevis*, recommandées par l'OCDE (2015) et l'EPA des États-Unis (2015), comprennent des concentrations limites pour les éléments suivants : matière particulaire 5 mg/L, COT 2 mg/L, ammoniac non ionisé 1 µg/L, chlore résiduel 10 µg/L, pesticides organophosphorés totaux 50 ng/L, pesticides organochlorés totaux plus polychlorobiphényles 50 ng/L, chlore organique total 25 ng/L, aluminium, arsenic, chrome, cobalt, cuivre, fer, plomb, nickel et zinc 1 µg/L, cadmium 100 ng/L, mercure 100 ng/L et argent 100 ng/L.

²⁹ Une aération vigoureuse de l'eau peut être appliquée pour éliminer une partie du chlore gazeux volatil. Cette étape pourrait être suivie par l'utilisation de filtres à charbon actif (charbon d'os) et d'un rayonnement ultraviolet (Armstrong et Scott, 1974) pour éliminer la plupart des chloramines résiduelles et d'autres composés organiques chlorés. Le vieillissement de l'eau dans des réservoirs aérés de maintien pendant un ou deux jours pourrait être bénéfique.

³⁰ Contrairement au chlore, les chloramines ne dégagent pas de gaz, ne s'évaporent pas et ne sont pas réduites par le vieillissement de l'eau. En revanche, les chloramines peuvent être éliminées à l'aide du thiosulfate de sodium ou de filtres à base de carbone (CCPA, 2021). Les laboratoires peuvent également traiter l'eau municipale avec un conditionneur (p. ex. Seachem® Prime®) et la laisser vieillir pendant deux jours avant de l'utiliser pour le maintien ou les essais; si cette approche est employée, on recommande d'effectuer des analyses chimiques avec de l'eau non traitée et de l'eau traitée avant les essais de toxicité définitifs pour confirmer que le conditionneur ne lierait pas la substance chimique ou la matière d'essai (S. Robinson, Environnement et Changement climatique

concentration nocive de chlore résiduel ou de chloramines, et effectuer une surveillance régulière (c.-à-d. au minimum hebdomadaire, avec une surveillance quotidienne recommandée) du chlore résiduel total (CRT)³¹. Outre la mesure du chlore, la surveillance de la santé des œufs et des têtards peut fournir la preuve que la qualité de l'eau est satisfaisante.

L'eau dure peut provoquer des problèmes de peau (p. ex. des lésions) chez certaines espèces d'amphibiens en perturbant la régulation osmotique normale. Il a également été démontré que l'eau dure (364 mg/L de CaCO₃) provoque des malformations de la colonne vertébrale (Budischak *et al.*, 2009). La plupart des amphibiens manifestent une préférence pour l'eau douce, mais cette préférence dépend de chaque espèce (Whitaker, 2001; Odum et Zippel, 2011). Quelle que soit la source d'eau, la dureté de l'eau d'élevage et de maintien pour *L. pipiens* devrait être comprise entre 10 et 230 mg/L de CaCO₃ (v. § 6.3)³².

Canada, Ottawa [Ontario], communication personnelle, 2023).

³¹ La valeur recommandée pour le chlore résiduel total nécessaire à la protection de la vie aquatique en eau douce est de 0,5 µg/L (CCME, 1999). Les valeurs supérieures à 0,5 µg/L pourraient entraîner une interaction entre la toxicité du chlore ou des chloramines et les contaminants à l'essai. Le CCPA recommande des valeurs inférieures à 10 µg/L (CCPA, 2021). La limite de détection pour la technique analytique servant à mesurer le chlore ou les chloramines résiduels dans l'eau déchlorée ou sans chloramine traitée devrait être, dans l'idéal, suffisamment faible pour s'assurer que le chlore résiduel est ≤ 0,5 µg/L. Cependant, cela pourrait s'avérer irréaliste pour les méthodes utilisées dans le laboratoire effectuant des mesures régulières. L'utilisation d'un équipement qui peut mesurer jusqu'à la limite de détection de 20 µg/L est acceptable et réalisable (P. Jackman, Environnement et Changement climatique Canada, Moncton [Nouveau-Brunswick], communication personnelle, 2022).

³² Le LEEA (2006) a étudié les effets de quatre eaux différentes d'élevage dont la dureté est comprise entre 20 et 150 mg/L de CaCO₃ sur l'éclosion des œufs, la capacité de survie, la croissance et la métamorphose des embryons de grenouilles léopards. On n'a constaté aucune différence significative entre les quatre eaux utilisées pour aucun des paramètres mesurés, ce qui indique que les eaux dont la dureté est comprise entre 20 et 150 mg/L conviennent à l'élevage et à l'analyse de *L. pipiens*. Au cours de l'étude interlaboratoire, il a été possible d'élever

Le pH de l'eau de maintien et d'élevage de *L. pipiens* devrait se situer entre 6,5 et 8,5³³. La teneur en oxygène dissous de l'eau des réservoirs de maintien et d'élevage devrait être de 80 % à 100 % de saturation en air. On devrait assurer une aération douce et continue des réservoirs (p. ex. 6,5 ± 1 mL/min-L) au moyen d'air comprimé filtré et exempt d'huile. L'air dans les réservoirs d'élevage et de maintien devrait être distribué à l'aide de tuyaux jetables et de pipettes jetables en verre ou en plastique ou, pour les réservoirs de grand volume, à l'aide de pierres poreuses d'aquariums. On devrait éviter une agitation vigoureuse.

Si de l'eau de surface est utilisée pour le maintien et l'élevage, elle devrait être filtrée (p. ex. ≤60 µm)

des organismes d'essai dans une eau dont la dureté était aussi faible que 10 mg/L de CaCO₃ et aussi élevée que 230 mg/L de CaCO₃. Ces données concordent avec les lignes directrices générales pour le maintien et l'élevage des amphibiens (Whitaker, 2001; Odum et Zippel, 2011).

³³ L'objectif du maintien et de l'élevage est de fournir des conditions favorables aux amphibiens. Bien que la plupart des ranidés d'Amérique du Nord soient relativement tolérants aux conditions acides (Lacoul *et al.*, 2011), la grenouille léopard est particulièrement sensible à l'acidification (Freda et Dunson, 1984 et Freda et Taylor, 1992 cités dans Rowe et Freda, 2000; Freda et McDonald, 1990). Ses œufs ne peuvent se développer normalement à un pH ≤5,8; par ailleurs, il a été démontré que les spermatozoïdes ont une motilité réduite à un pH <6,5 et son seuil léthal (pH>4,0) est plus élevé que celui des autres espèces de ranidés d'Amérique du Nord (Schlichter, 1981; Freda, 1986; Lacoul *et al.*, 2011). Les études ont démontré que *L. pipiens* évite l'eau ayant un pH de 4,0, mais pas celle ayant un pH de 4,5 (Freda et Taylor, 1992 cités dans Row et Freda, 2000). Aucune différence n'a été observée entre les pH 6,8 et 7,5 en ce qui concerne le succès du développement des œufs exposés à différents niveaux de pH pendant 48 heures (Schlichter, 1981). Dans le cadre d'une autre étude, les embryons, les nouveau-nés et les têtards de trois semaines ont affiché une faible mortalité dans les eaux témoins ayant un pH de 6,5 lors d'une exposition de quatre ou cinq jours (Freda et McDonald, 1990). En général, les embryons d'amphibiens sont les plus sensibles à un pH faible, la tolérance augmentant avec l'âge larvaire (Pierce, 1985 cité dans Horne et Dunson, 1995; Freda, 1986; Freda et McDonald, 1990). Les limites de pH recommandées ici pour le maintien et l'élevage de *L. pipiens* sont conformes à ces résultats et aux recommandations générales pour l'élevage des amphibiens (Whitaker, 2001; Odum et Zippel, 2011; CCPA, 2021).

pour en éliminer les prédateurs et concurrents potentiels des embryons et des larves. Un filtre à sable classique ou un filtre commercial en ligne (p. ex. de 0,45 à 5 µm) conviendrait également pour obtenir une filtration plus fine. On recommande une stérilisation aux rayons ultraviolets (UV) pour réduire la possibilité d'introduire des agents pathogènes dans la colonie de grenouilles.

L'eau des récipients contenant des embryons, des larves ou des adultes doit être renouvelée au moyen d'un *renouvellement intermittent* ou d'un *renouvellement continu* afin d'éviter l'accumulation de déchets métaboliques³⁴. Dans le cas d'un renouvellement intermittent (c.-à-d. sans filtre et avec une qualité d'eau maintenue simplement par des changements d'eau), 50 % de l'eau des réservoirs d'élevage devrait être siphonnée et remplacée par de l'eau d'élevage propre au moins trois fois par semaine, ou plus souvent en cas de problèmes de qualité de l'eau. Les embryons et les larves doivent rester immergés lors des renouvellements. Dans le cas d'un renouvellement continu, on devrait observer attentivement les têtards et les récipients pour déceler les problèmes potentiels associés à des débits d'eau trop élevés (p. ex. retard de croissance dû à l'augmentation de l'énergie nécessaire pour se déplacer dans le récipient; encrassement dû à l'accumulation de nourriture dans des zones particulières du récipient) (M. Gallant, Nautilus Environmental Inc., Burnaby [Colombie-Britannique], communication personnelle, 2023). Le débit devrait être contrôlé, de préférence quotidiennement. L'ammoniac et les nitrites devraient être mesurés fréquemment pour vérifier qu'ils n'atteignent pas des niveaux néfastes. Les valeurs cibles pour le maintien et l'élevage de *L. pipiens* recommandées ici sont ≤0,2 mg/L

³⁴ Un système de recyclage en conditions statiques peut être utilisé pour maintenir les embryons ou les larves; cependant, ce type de système n'a pas été évalué lors de l'élaboration de cette méthode ni lors des études interlaboratoires. En conséquence, aucune directive ne peut être fournie concernant les systèmes de recyclage en conditions statiques pour le maintien des embryons ou des larves. Dans le cas du système de recyclage en conditions statiques, un filtre adapté à l'élimination des déchets métaboliques est utilisé, et l'eau recyclée est filtrée pour éliminer les déchets solides et les billes biologiques. On ajoute souvent un éliminateur d'ammoniac au filtre pour contrôler les concentrations d'ammoniac et de nitrite dans l'eau (CCPA, 2005; Timmons *et al.*, 2018).

d'ammoniac non ionisé³⁵ et ≤ 1 mg/L de nitrite³⁶. L'eau qui pénètre dans les récipients de maintien et

³⁵ Les récentes lignes directrices du CCPA visant les amphibiens (2021) recommandent des niveaux d'ammoniac non ionisé inférieurs à 0,02 mg/L. Les lignes directrices du CCME (2010) recommandent une valeur de 0,019 mg/L d'ammoniac non ionisé d'après l'étude sur la valeur la plus sensible en eau douce déterminée, à savoir la toxicité de l'ammoniac pour la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Dans une étude réalisée par Jofre et Karasov (1999), des concentrations d'ammoniac non ionisé supérieures à 1,5 mg/L ont eu des effets négatifs sur *L. pipiens*, ce qui a entraîné des répercussions négatives sur l'éclosion et le pourcentage de malformations, la croissance et le développement des embryons exposés pendant cinq jours. Les auteurs indiquent que les anoues ne sont peut-être pas aussi sensibles à l'ammoniac que certaines espèces de poissons, notamment la truite arc-en-ciel, les effets sur les embryons ayant été observés à des concentrations 10 et 100 fois inférieures à celles observées dans leur étude pour *L. pipiens*. Dans une étude plus récente sur les effets de l'ammoniac sur les larves de *L. pipiens*, des têtards au SG 27 ont été exposés à diverses concentrations d'ammoniac au cours d'un essai de 21 jours (LEEA, 2015). Les résultats ont montré que des niveaux moyens d'ammoniac non ionisé de 0,23 mg/L (allant jusqu'à 0,33 mg/L) n'avaient aucun effet sur la capacité de survie, la croissance (poids humide, longueur du museau-cloaque et longueur de la queue) et le développement (stade de Gosner) des têtards. Les valeurs d'ammoniac non ionisé dans les solutions témoins sont restées $\leq 0,01$ mg/L pendant la durée de l'exposition de 21 jours, avec 10 têtards par répétition de 6 L et des renouvellements d'eau trois fois par semaine (LEEA, 2015). L'objectif recommandé de $\leq 0,2$ mg/L est conforme à ces résultats et aux recommandations générales pour l'élevage des amphibiens recommandées par Odum et Zippel (2011).

³⁶ La valeur recommandée par le CCME pour les nitrites est de 0,06 mg/L (CCMRE, 1987). Dans une étude sur l'effet des nitrites sur la grenouille à pattes rouges (*Rana cascadae*), les têtards au SG 39-40 exposés à une concentration de nitrites (N-NO₂⁻) de 3,5 mg/L pendant 14 jours se sont développés plus lentement et ont émergé à un stade de développement plus précoce. En outre, ils ont occupé plus fréquemment des eaux peu profondes. Aucun effet n'a été observé sur le moment d'émergence ou sur la longueur du museau-cloaque au moment de l'émergence au même niveau d'exposition (Marco et Blaustein, 1999). Les récentes lignes directrices du CCPA pour les amphibiens recommandent des niveaux de nitrite inférieurs à 1 mg/L et des niveaux de nitrate inférieurs à 50 mg/L (CCPA, 2021). La valeur recommandée de

d'élevage ne devrait pas être sursaturée en gaz. Des mesures correctives doivent être prises (p. ex. utilisation de colonnes d'aération ou aération vigoureuse dans un réservoir ouvert) si les gaz dissous dépassent 100 % de saturation.

Pour que la métamorphose se déroule normalement, les larves de grenouille doivent recevoir des quantités suffisantes d'iode pour la synthèse des hormones thyroïdiennes. Elles peuvent les obtenir par l'intermédiaire de l'eau ou de sources alimentaires, ou des deux (USEPA, 2015). À l'heure actuelle, aucune ligne directrice empirique n'a été rédigée concernant les concentrations minimales d'iode dans les aliments ou dans l'eau pour garantir un bon développement (USEPA, 2015). Les niveaux d'iode devraient être mesurés dans l'eau témoin, d'élevage et de dilution (et, si nécessaire, dans la nourriture des têtards) afin de contrôler les niveaux d'exposition. Des niveaux d'iode compris entre 1 et 3,3 µg/L ont été mesurés dans les eaux témoins et de dilution utilisées par plusieurs laboratoires canadiens lors des essais avec *L. pipiens*³⁷. Ces niveaux devraient être utilisés comme des lignes directrices pour s'assurer qu'une quantité suffisante d'iode est disponible afin de permettre le bon fonctionnement de la glande thyroïde et, par conséquent, un développement adéquat.

La qualité de l'eau dans les réservoirs d'élevage doit être contrôlée et consignée régulièrement. Pour les

≤ 1 mg/L de nitrite est conforme à ces résultats et aux recommandations générales pour l'élevage des amphibiens recommandées par Whitaker (2001) et Odum et Zippel (2011).

³⁷ Au cours de l'étude interlaboratoire d'Environnement et Changement climatique Canada, les laboratoires participants ont contrôlé les niveaux d'iode dans l'eau propre témoin et de dilution, ainsi que dans les répétitions témoins juste avant les changements d'eau (c.-à-d. après deux jours d'exposition en conditions statiques avec alimentation). Ces niveaux variaient de 1,0 à 2,3 µg/L d'iode dans l'eau propre et de 2,1 à 3,3 µg/L d'iode dans l'eau de deux jours (Nautilus Environmental, 2020a). Ces données indiquent que la nourriture et/ou la variabilité des niveaux présents dans l'eau témoin et de dilution (c.-à-d. l'eau du robinet déchlorée) peuvent entraîner des conséquences sur les niveaux d'iode auxquels les têtards sont exposés, étant donné que ces valeurs peuvent fluctuer au fil du temps.

embryons et les larves, la température de l'eau doit être mesurée quotidiennement. L'oxygène dissous et le pH doivent être mesurés à intervalles réguliers afin de documenter la qualité de l'eau³⁸. On recommande de contrôler régulièrement (p. ex. chaque semaine ou plus fréquemment si nécessaire) les niveaux d'ammoniac, de nitrite, de conductivité et de chlore résiduel total (si l'eau provient d'une source municipale). La dureté et l'alcalinité de l'eau d'élevage devraient être mesurées aussi souvent que nécessaire pour documenter la qualité de l'eau. On recommande de mesurer ces variables au moins une fois pendant la période d'élevage des têtards ainsi que la veille du début d'un essai.

2.3.6 Alimentation des grenouilles

Différents types d'aliments et de régimes alimentaires ont été utilisés pour l'élevage de têtards destinés aux essais de toxicité (LEEA, 2004; APHA *et al.*, 2011; Nautilus Environmental, 2014). Une expérience d'alimentation détaillée a été menée, comparant quatre régimes différents, à partir du stade 25 de Gosner. Un mélange de chou fourrager et de nourriture séchée pour têtards distribué trois fois par semaine, ainsi qu'un ou plusieurs agglomérés d'algues distribués une fois par semaine, s'est révélé le régime optimal (Nautilus Environmental, 2016). Ce régime a été utilisé avec succès au LEEA et a été utilisé avec succès pour nourrir les têtards au cours des études interlaboratoires.

Les têtards doivent être nourris à volonté dès qu'ils atteignent le stade 25 de Gosner (v. § 2.1). Le type de nourriture recommandé pour *L. pipiens* est un mélange 4:1 de chou fourrager et de nourriture

³⁸ Même une augmentation inattendue de la température pendant une journée en raison d'un dysfonctionnement de l'équipement peut entraîner des répercussions sur la santé des organismes d'essai (L. Van der Vliet, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa [Ontario], communication personnelle, 2021). Comme il a été démontré que des changements inattendus à court terme influent sur la santé des organismes d'essai, la température doit être contrôlée quotidiennement. Par ailleurs, la température peut être ajustée quotidiennement lors de l'acclimatation des masses d'œufs, et ces changements quotidiens doivent être consignés (v. § 2.3.4). Une fréquence de surveillance à trois fois par semaine, ou avant et après le renouvellement de l'eau, constitue un exemple d'intervalles réguliers pour la surveillance de l'oxygène dissous et du pH.

séchée pour têtards (p. ex. nourriture Ward's® pour les têtards *Xenopus*, disponible auprès de Boreal Science ou de VWR International, numéro de catalogue 470030-346)³⁹. Le chou fourrager (frisé) est défait et les feuilles sont bouillies ou cuites à la vapeur pendant plusieurs minutes pour les ramollir. Le chou fourrager est ensuite égoutté ou épongé et refroidi avant la distribution. Ce chou fourrager préparé peut être congelé en petites quantités jusqu'à un an. Il est également possible d'utiliser du chou fourrager biologique acheté surgelé sans le cuire à la vapeur. Le chou fourrager surgelé est décongelé avant d'être utilisé et la plus grande partie de l'eau est extraite avant d'être pesée. Une bouillie de chou fourrager et de nourriture pour têtards peut être préparée en combinant grossièrement le mélange avec une petite quantité d'eau témoin⁴⁰. Les têtards devraient être nourris trois fois par semaine avec le régime chou fourrager/nourriture pour têtard. La quantité variera en fonction du nombre et de la taille des têtards dans chaque réservoir d'élevage; voici quelques exemples de fréquences d'alimentation : 2 g de chou fourrager : 0,5 g de nourriture pour têtards pour 100 têtards au SG 25, ou 3 g de chou fourrager : 0,75 g de nourriture pour têtards pour 100 têtards au SG 26-29, par phase d'alimentation. La quantité peut être augmentée si la nourriture est entièrement consommée chaque jour. Toutefois, s'il reste de la nourriture après deux jours, la quantité devrait être diminuée. Une fois par semaine (la quatrième distribution de nourriture par semaine), les têtards devraient être nourris avec des agglomérés d'algues séchées (p. ex. des mini

³⁹ Le LEEA a étudié plusieurs régimes alimentaires pour les têtards, y compris les épinards congelés (décongelés), la laitue romaine bouillie, la nourriture séchée pour têtards Ward, Tetramin, la nourriture pour truites, les agglomérés d'algues, des crustacés *Artemia* nouvellement éclos et le chou fourrager bouilli. Au cours des expériences d'alimentation, il a déterminé que le mélange de chou fourrager et de nourriture pour têtards permettait à 62,5 % des têtards d'atteindre la métamorphose, contre ≤37,5 % des têtards dans les autres variantes expérimentales; ce mélange a donc été choisi comme principal régime alimentaire pour les têtards (LEEA, 2004).

⁴⁰ Il est important de ne pas trop brasser le mélange de nourriture pour têtards de chou fourrager, car les feuilles de chou fourrager sont utiles pour fournir un indicateur visuel de l'alimentation donnée à volonté (Nautilus Environmental, 2020a).

gaufrettes aux algues Hikari) au lieu du mélange de chou fourrager et de nourriture pour têtards. Les agglomérés d'algues séchées sont également donnés à volonté, et les quantités estimées commencent normalement à un taux cible de 3 % du poids corporel total de tous les têtards dans un réservoir donné. Les agglomérés d'algues peuvent être brisés ou partiellement broyés avant d'être donnés.

2.3.7 Manipulation des organismes et maintien des élevages

On devrait manipuler le moins possible les embryons et les larves pour éviter de les blesser ou de les stresser inutilement. S'il faut les manipuler, il faudrait le faire doucement, soigneusement et rapidement, pour réduire au minimum le stress subi par les animaux. On peut utiliser des pipettes de transfert à large diamètre ou des petites cuillères en plastique pour transférer les embryons. On peut utiliser de petites épaisseuses ou de petits gobelets pour transférer les têtards. Le port de gants est obligatoire lors de la manipulation d'embryons ou de larves afin d'éviter la transmission potentielle de substances nocives ou d'agents pathogènes aux organismes. On recommande de porter des gants rincés et exempts de poudre; par ailleurs, il ne faut pas utiliser de gants en latex sauf s'il a été prouvé qu'ils n'étaient pas toxiques pendant une étude en laboratoire (v. § 2.4.4 et l'annexe E.2.1 pour plus de détails).

Il est recommandé d'inspecter régulièrement le contenu de chaque récipient de maintien immédiatement avant chaque distribution de nourriture, pour déterminer l'état apparent des organismes d'essai et celui des réservoirs de maintien. Le bien-être de l'organisme devrait être évalué à ce moment-là (p. ex. les changements dans l'alimentation ou d'autres comportements, les interactions sociales telles que l'agression, et l'apparence telle que la couleur de la peau); des recommandations d'indicateurs de bien-être sont disponibles dans le § 9.1 des lignes directrices du CCPA pour les amphibiens (CCPA, 2021); des renseignements supplémentaires sur le comportement et l'apparence anormale des têtards sont décrits dans le § 4.4. Il faudrait consigner dans un registre l'état apparent de l'élevage (organismes et réservoirs de maintien/élevage) au moment de chaque observation (v. § 2.3.2). Le nombre d'embryons et d'éclosions doit être estimé et consigné, de même que le nombre d'organismes

morts, malades ou moribonds retirés de chaque réservoir de maintien et d'élevage. Lors du retrait des nouveau-nés morts, il faudrait faire très attention à ne pas heurter ou endommager les embryons adjacents, car ils sont extrêmement délicats et sensibles jusqu'au stade 19 ou 20 de Gosner (ASTM, 2022a). Les modes opératoires proposés pour l'évaluation des têtards individuels (c.-à-d. le stade de développement, la longueur et le poids) avant le début de l'essai, pendant les mesures intermédiaires de l'essai et à la fin de l'essai sont présentés au § 4.2.

Les réservoirs devraient être siphonnés régulièrement pour éliminer les déchets solides et les débris. L'eau des récipients de maintien et d'élevage d'embryons et de larves devrait être renouvelée, comme l'indique le § 2.3.5.

2.3.8 Critères de santé de l'organisme d'essai

Les têtards élevés ou maintenus aux fins d'utilisation dans un essai doivent être contrôlés quotidiennement. Les individus qui semblent en mauvaise santé (p. ex. décolorés, pliés, d'apparence anormale), inactifs, stressés ou morts lorsqu'ils sont délicatement palpés ne doivent pas être utilisés pour les essais⁴¹. Dans le cas des organismes maintenus à des fins d'essai, le taux de mortalité cumulé devraient être $\leq 5\%$, et doivent être $\leq 10\%$ dans les cinq jours précédant le début de l'essai (Environnement et Changement climatique Canada, 2023)⁴².

⁴¹ Il est possible que des organismes semblent en bonne santé avant et pendant les essais aux premiers stades de développement, mais qu'ils présentent ensuite un faible taux de survie et des taux élevés de difformité aux stades de développement ultérieurs (p. ex. > SG 33); cette situation est particulièrement préoccupante pour les masses d'œufs prélevées sur le terrain, où les conditions environnementales telles que la température, l'exposition aux rayons ultraviolets, le taux de fécondation et l'exposition aux maladies échappent au contrôle du laboratoire (M. Gallant, Nautilus Environmental, Calgary [Alberta], communication personnelle, 2023). Si l'on dispose de plusieurs masses d'œufs, il peut être utile d'utiliser deux ou trois masses d'œufs pour un essai afin de se prémunir contre cette éventualité (v. § 4.2).

⁴² Calcul de l'échantillon : l'essai commence au jour 0. À la fin du jour -6, on compte environ 500 nouveau-nés.

Les têtards au stade 25 de Gosner nagent et se nourrissent activement, et sont caractérisés par les repères physiques suivants : opercule complet; pas de filaments branchiaux externes; *spiracle* sur le côté gauche (v. fig. 2.1). Au début de l'essai (c.-à-d. pour l'essai de 14 jours), les têtards devraient se situer dans la fourchette des mesures attendues pour le stade de développement SG 25, à savoir : 0,01-0,04 g en poids humide, 3-6 mm pour la longueur du museau-cloaque et 10-14 mm pour la longueur totale.

Les têtards au SG 28/29 nagent et se nourrissent activement et on peut observer des bourgeons de membres postérieurs d'une longueur supérieure ou égale à la profondeur du bourgeon de membre (pour le SG 28) ou 1,5 fois la profondeur du bourgeon de membre (pour le SG 29). Au début de l'essai (c.-à-d. pour l'essai de 42 jours), les têtards à ces stades de développement devraient avoir un poids humide de 0,16 à 0,48 g, une longueur du museau-cloaque de 9 à 13 mm et une longueur totale de 24 à 34 mm. Des têtards de taille semblable devraient être utilisés pour commencer un essai.

Étant donné que les taux de croissance et de développement peuvent varier considérablement au sein d'un lot donné de *L. pipiens*, un élevage supérieur au nombre nécessaire dans l'essai devrait être entrepris afin de disposer d'un nombre suffisant d'organismes d'essai au stade de développement requis. Pour l'essai de 42 jours (nécessitant des têtards au SG 28/29 au début de l'essai), il est

Jour	Nombre d'organismes morts
Jour -5	5
Jour -4	3
Jour -3	5
Jour -2	2
Jour -1	3
Jour 0	2
Total	20

Au total, 20 organismes sur 500 ont été trouvés morts dans les cinq jours précédant l'essai, le taux de mortalité cumulé est donc de 4 %. Il est à noter que la mortalité peut être difficile à évaluer avec précision, car les têtards morts pourraient être mangés avant l'évaluation (Environnement et Changement climatique Canada, 2023). Les têtards qui sont retirés du réservoir de maintien et d'élevage pour des raisons autres que la mortalité (p. ex. têtards \geq SG 30 si l'on n'a besoin que de têtards au SG 28/29) ne rentrent pas dans le calcul de la mortalité.

recommandé aux laboratoires d'élever jusqu'à quatre fois le nombre d'organismes nécessaires à l'essai (Nautilus Environmental, 2020b).

2.3.9 Santé, quarantaine et maladies des embryons et des larves

Les réservoirs contenant des œufs ou des têtards devraient faire l'objet d'une vérification quotidienne au cours de laquelle il faut contrôler et consigner les performances de l'élevage (v. § 2.3.2, 2.3.6, 2.3.7 et 2.3.8). On devrait évaluer régulièrement et corriger au besoin les conditions et les modes opératoires utilisés pour le maintien de chaque élevage, afin de préserver ou de restaurer sa santé. Si l'élevage semble en mauvaise santé ou atypique pendant une vérification, on devrait le vérifier plus fréquemment, pour s'assurer qu'il n'y survient pas une mortalité en cascade (c.-à-d. que le taux de mortalité augmente exponentiellement en fonction du temps). Des renseignements supplémentaires sur les maladies courantes chez *Lithobates pipiens* sont fournis à l'annexe E.

L'apparence des œufs sains et fécondés est décrite au § 2.1. Les œufs morts sont de couleur blanche et ne devraient être retirés que s'ils forment de grandes sections sur les bords de la masse d'œufs (v. § 2.3.7). Les têtards en bonne santé devraient être de couleur foncée et, à l'éclosion, ils tombent d'abord au fond du réservoir en bougeant peu, mais ils nagent activement et se fixent aux parois du réservoir en un jour ou deux (LEEA, 2020). Les têtards devraient nager activement après le stade 20 de Gosner (nouveau-né) et se nourrir activement après le stade 25 de Gosner.

Des mesures supplémentaires de la santé des organismes peuvent être obtenues par l'utilisation d'essais de toxicité de référence et le suivi des performances des témoins. Il existe deux options d'essai pour satisfaire aux exigences minimales : utiliser une substance de référence connue (p. ex. le chlorure de sodium ou la thyroxine) et utiliser une partie du même lot d'organismes que celui utilisé pour commencer l'essai de toxicité définitif (v. § 4.8). Tous les essais effectués avec le ou les toxiques de référence devraient être réalisés dans les conditions et selon les modes opératoires exposés dans le § 4.8. Les critères expérimentaux utilisés pour juger de la validité d'un essai particulier de toxicité (et, indirectement, de la santé de l'élevage) d'après la performance des organismes

expérimentaux dans l'eau témoin/de dilution sont décrits dans le § 4.7.

Un laboratoire qui effectue régulièrement (c.-à-d. plusieurs fois par an ou plus) des essais de toxicité avec des amphibiens pourrait trouver utile de surveiller les données relatives à la survie, à la croissance et au développement dans l'eau témoin/de dilution, comme mesure de la santé d'un lot donné d'organismes d'essai et leurs performances. Les résultats, indiqués sur un graphique en fonction du temps (c.-à-d. les cartes de contrôle des performances), sont utiles pour contrôler l'acceptabilité du système d'essai et des conditions environnementales, la compétence du technicien effectuant l'essai, ainsi que les performances et l'état de santé des organismes d'essai.

2.4 Maintenance et reproduction de grenouilles adultes

Cette section fournit des indications sur le maintien et l'acclimatation des adultes en vue de leur utilisation pour la reproduction.

2.4.1 Généralités

Les conditions recommandées et requises pour la mise en quarantaine, le maintien, l'acclimatation, l'hibernation et la reproduction des adultes de *Lithobates pipiens*, résumées dans le tableau 3, sont destinées à permettre un certain degré de flexibilité au sein d'un laboratoire. Bien que des orientations et des recommandations soient fournies dans le présent document, des instructions explicites concernant de nombreux aspects de la conservation, notamment le choix des récipients de conservation, le nombre d'organismes par récipient et les conditions de renouvellement de l'eau, sont laissées à la discrétion et à l'expérience du personnel de laboratoire. Une grande partie du § 2.4 découle des modes opératoires établis dans le cadre de recherches menées par des laboratoires canadiens; toutefois, des modes opératoires généraux pour l'élevage des amphibiens (v. les références à l'annexe E) peuvent être consultés et suivis si des détails supplémentaires sont nécessaires. En outre, il est recommandé de manipuler tous les organismes conformément aux lignes directrices du CCPA (2021) pour les amphibiens, et/ou conformément aux conseils des vétérinaires et des comités de protection des animaux, le cas échéant, afin d'intégrer la partie

« raffinement » des trois R dans les modes opératoires de manipulation des animaux (v. § 4.9).

2.4.2 Maintien de grenouilles adultes

De petits groupes de mâles et de femelles adultes de *L. pipiens* peuvent être maintenus dans des récipients dotés d'un habitat et de repères environnementaux appropriés. Les grenouilles adultes peuvent être maintenues dans une variété de récipients fabriqués à partir de matériaux non toxiques tels que le verre, l'acier inoxydable, la porcelaine, le polyester renforcé de fibre de verre, les plastiques perfluorocarbonés (Téflon^{MC}), l'acrylique, le polyéthylène ou le polypropylène. Des récipients rectangulaires de 1 m de large × 3 m de long × 30-50 cm de haut conviennent pour maintenir 12 à 20 adultes de *L. pipiens*. Ces récipients de maintien devraient offrir un habitat aquatique et terrestre (v. les figures E.1 et E.2 de l'annexe E). Les récipients devraient être remplis d'eau d'élevage (v. § 2.3.5) à un niveau où les animaux peuvent s'immerger complètement (c.-à-d. ≥ 20 cm pour les adultes), et équipés d'une forme de contrôle de la température et d'aération. L'habitat terrestre peut être constitué de pierres et de graviers de rivière, de plexiglas ou de polystyrène recouvert de terreau et de mousse humide. Le terreau utilisé comme substrat doit être exempt d'engrais et de pesticides. Il est recommandé d'utiliser comme substrat des feuilles, de la sphaigne ou de la fille de l'air. La mousse devrait être trempée dans de l'eau d'élevage avant d'être utilisée et il peut être nécessaire de la tamponner (consulter les instructions dans la note de bas de page 11 dans EC, 2014) pour s'assurer que son pH est adéquat avant de l'utiliser (v. la note de bas de page 33 dans le § 2.3.5). Des matériaux supplémentaires tels que des rondins, des plantes en plastique ou des demi-sceaux devraient être inclus dans les récipients de maintien pour fournir un abri et des cachettes supplémentaires. Chaque récipient de maintien devrait être muni d'un couvercle perforé (p. ex. un grillage) pour empêcher les grenouilles de s'échapper et pour permettre l'échange d'air et le passage de la lumière. L'humidité est un facteur à prendre en compte pour le maintien d'amphibiens, et selon les recommandations du CCPA (2021), les installations doivent être capables de maintenir un taux d'humidité d'environ 50 %. Les réservoirs et l'équipement devraient être nettoyés et désinfectés avant l'introduction d'un nouveau lot de grenouilles adultes.

Tableau 3. Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés et exigés pour la mise en quarantaine, le maintien et la reproduction de grenouilles adultes de *Lithobates pipiens* destinées à des essais de mesure de la toxicité aquatique

Origine des <i>Lithobates pipiens</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Adultes de <i>Lithobates pipiens</i> exempts de maladie (pour fournir des organismes d'essai) provenant de fournisseurs de matériel biologique, d'un autre laboratoire ou d'une collecte sur le terrain; ils doivent être identifiés avec certitude jusqu'à l'espèce; toute l'information nécessaire à l'identification adéquate des organismes collectés ou expédiés à un laboratoire d'essai doit être obtenue pour chaque lot ou envoi et doit inclure, à tout le moins : <ul style="list-style-type: none"> o Pour les organismes achetés auprès d'un fournisseur de matériel biologique ou d'un autre laboratoire : la quantité et l'origine des adultes de chaque envoi; le nom du fournisseur; la date de l'envoi; la date d'arrivée au laboratoire d'essai; l'état à l'arrivée; l'identification des espèces. o Pour les organismes prélevés sur le terrain : la date et l'heure du prélèvement; le lieu; le nombre d'adultes prélevés; les conditions sur le site de prélèvement; la date de l'envoi; la date d'arrivée au laboratoire d'essai; l'état à l'arrivée; l'identification des espèces.
Saison de frai de <i>Lithobates pipiens</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Pour les animaux féraux : généralement de la mi-avril à la mi-mai, et jusqu'en juin plus au nord; pendant la migration d'automne ou en hiver depuis les gîtes d'hivernage également; pour les fournisseurs commerciaux : de septembre à juillet.
Acclimatation/mise en quarantaine des grenouilles adultes	<ul style="list-style-type: none"> - Désinfection des réservoirs et de l'équipement avant l'introduction de nouvelles grenouilles adultes; les nouvelles grenouilles adultes peuvent être mises en quarantaine pendant 2 semaines ou plus (c.-à-d. 6 à 8 semaines).
Réservoirs de maintien/conditions	<ul style="list-style-type: none"> - Réservoirs en fibre de verre de 1 m de large × 3 m de long × 30-50 cm de haut pour 12 à 20 grenouilles adultes par réservoir; habitat terrestre et aquatique (v. annexe E.1); couverts pour empêcher les fuites, mais permet à la lumière et à l'air de pénétrer dans l'enceinte; profondeur de l'eau ≥20 cm; les plantes en plastique devraient être désinfectées et la mousse dans les réservoirs pour adultes devrait être remplacée une fois tous les deux mois et en cas de mortalité, et le substrat terrestre devrait être nettoyé et désinfecté ou remplacé selon les besoins.
Provenance de l'eau	<ul style="list-style-type: none"> - Eau souterraine ou de surface non contaminée, eau municipale déchlorée ou sans chloramine d'une dureté comprise entre 10 et 230 mg/L sous forme de CaCO₃, tel qu'il est décrit dans le § 2.3.5.
Renouvellement de l'eau	<ul style="list-style-type: none"> - Remplacement par renouvellement continu ou intermittent; renouvellement continu : faible débit continu, équivalent à un renouvellement ≥50 % au minimum une fois par semaine; renouvellement intermittent : renouvellement ≥50 % au minimum une fois par semaine (de préférence deux fois); si nécessaire, l'eau est aspirée pour éliminer les débris.
Qualité de l'eau	<ul style="list-style-type: none"> - Température mesurée quotidiennement; oxygène dissous et pH de chaque réservoir mesurés régulièrement (p. ex. trois fois par semaine, ou avant et après le renouvellement de l'eau); l'ammoniac, les nitrites, la conductivité et le chlore résiduel total (si de l'eau municipale déchlorée ou sans chloramine est utilisée) sont mesurés régulièrement (p. ex. chaque semaine ou plus fréquemment); la dureté, l'alcalinité, le carbone organique total (COT), les solides en suspension, les gaz dissous totaux, les nitrates, les métaux et les pesticides mesurés si nécessaire pour documenter la qualité de l'eau; le débit de chaque réservoir de maintien est contrôlé, de préférence chaque jour, si l'on utilise un système à renouvellement continu.
Température	<ul style="list-style-type: none"> - Acclimatés dès leur réception à une température journalière moyenne de 20 ± 2 °C, à une température instantanée de 20 ± 3 °C; température atteinte selon une progression de ≤3 °C/jour.
Oxygène/aération	<ul style="list-style-type: none"> - Saturation en oxygène dissous de 80 à 100 %; maintenue par une aération continue à l'aide d'air filtré et exempt d'huile.
pH	<ul style="list-style-type: none"> - De 6,5 à 8,5.

Éclairage	<ul style="list-style-type: none"> - Éclairage incandescent, fluorescent ou à DEL à spectre continu, jumelé à des lampes spécialisées pour les amphibiens et les reptiles, avec un éclairage plus intense en rayonnement ultraviolet A et B (p. ex. Exo Terra Repti Glo 5.0); 100 à 500 lux à la surface de l'eau/terrestre; photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité; période de transition recommandée de 15 à 30 minutes entre les phases de lumière et d'obscurité; lampe supplémentaire avec ampoule rouge pour lézarder allumée 24 heures par jour (p. ex. ampoule de 60 watts pour reptiles Nightlight Red^{MC} de Zoo Med).
Alimentation	<ul style="list-style-type: none"> - Donner 3 fois par semaine une variété de nourriture vivante comprenant des grillons, des vers de terre et des larves de ténébrion; chaque distribution de nourriture équivaut à 3 insectes par grenouille (c.-à-d. qu'il peut s'agir d'une combinaison de grillons et de vers); au moins deux fois par semaine, les insectes sont légèrement saupoudrés d'un mélange 1:4 de vitamines (p. ex. Reptivite^{MC}) et de CaCO₃ avant d'être distribués; il faudrait enlever et éliminer toute nourriture non consommée accompagnée de moisissure ou des champignons avant de nourrir les animaux.
Manipulation des organismes	<ul style="list-style-type: none"> - Port de gants pour manipuler les grenouilles; manipulation minimale des grenouilles.
Santé de l'élevage	<ul style="list-style-type: none"> - Surveiller les récipients de maintien au moins trois fois par semaine juste avant la distribution de nourriture; évaluer le bien-être des animaux (p. ex. leur comportement alimentaire et autre, la couleur de leur peau et leur apparence); retirer les grenouilles mortes, mettre en quarantaine et traiter les grenouilles adultes malades ou moribondes. - Tenir des registres pour chaque grenouille, y compris l'origine, le poids, la date de réception, les doses et dates des maladies/médicaments, l'hibernation, les injections d'hormones, les tentatives de reproduction et une photo des taches pour identifier l'individu (il est également possible de marquer les organismes). - En cas de traitement pour la prévention ou le contrôle d'une maladie, attendre au moins 2 semaines avant de collecter les œufs à utiliser dans les essais de toxicité.
Hibernation	<ul style="list-style-type: none"> - Placer les grenouilles en hibernation dans une chambre à température et photopériode contrôlées (v. annexe F.2); placer les grenouilles dans des récipients en plastique à moitié remplis d'eau d'élevage ou d'une solution de Ringer 1:20, jusqu'à un maximum de 6 grenouilles/20 L; les mâles et les femelles sont conservés dans des réservoirs d'hibernation séparés; ajuster la température et la photopériode au besoin selon un calendrier (p. ex. tableau F.1); renouvellement continu avec faible débit continu ou renouvellement intermittent avec un remplacement de ≥50 % par jour pendant les deux premières semaines et trois fois par semaine par la suite; les grenouilles sont dérangées le moins possible. - Mesurer quotidiennement la température de l'air et de l'eau; mesurer l'oxygène dissous et le pH au moment du renouvellement s'il s'agit d'un renouvellement intermittent, ou au moins trois fois par semaine s'il s'agit d'un renouvellement continu.
Reproduction	<ul style="list-style-type: none"> - Les grenouilles reçoivent une dose d'amorçage d'agoniste de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH-A), puis une dose combinée de GNRH-A et de chlorhydrate de métoprolamide (MET); les hormones sont administrées par injections intrapéritonéales (v. l'annexe F.3) - Après les injections d'hormones, les adultes sont placés dans de grands réservoirs de reproduction couverts ou dans des aquariums avec une surface terrestre et un substrat de ponte (p. ex. des plantes en plastique) dans la colonne d'eau; profondeur de l'eau ≥20 cm; jusqu'à 10 grenouilles par réservoir; un rapport mâle/femelle de 3:2 est recommandé; les réservoirs de reproduction sont surveillés quotidiennement et tout cas d'amplexus ou de ponte est consigné; les grenouilles sont dérangées le moins possible.

Les renseignements contenus dans ce tableau ne sont qu'un résumé. Les exigences et recommandations définitives de cette méthode d'essai figurent dans le corps du présent document.

Les sources d'eau pour le maintien des adultes de *L. pipiens* peuvent être de l'eau souterraine « non contaminée », de l'eau de surface ou de l'eau potable municipale déchlorée ou sans chloramine, avec une dureté de 10 à 230 mg/L sous forme de CaCO₃, un pH de 6,5 à 8,5 et une saturation en oxygène dissous de 80 à 100 %, comme l'indique le § 2.3.5. L'eau des récipients de maintien contenant les adultes devrait être renouvelée en continu avec un faible débit continu, ou faire l'objet d'un renouvellement intermittent avec un renouvellement ≥50 % au moins une fois par semaine. S'il s'agit d'un renouvellement continu, le débit devrait être contrôlé, de préférence quotidiennement, et, si nécessaire, l'eau peut être aspirée régulièrement pour éliminer les déchets solides et les débris.

Il faudrait maintenir les adultes de *L. pipiens* sous un éclairage vertical utilisant une lumière fluorescente, incandescente ou à DEL à spectre continu, jumelée à des ampoules spéciales pour amphibiens/reptiles qui fournissent des quantités plus importantes de rayonnement ultraviolet A et B (p. ex. EXO Terra Repti Glo 5.0). L'intensité lumineuse devrait être de 100 à 500 lux à la surface de l'eau/terrestre. La photopériode devrait normalement être de 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité, avec une transition de 15 à 30 minutes entre la lumière et l'obscurité (v. la note de bas de page 23 du § 2.3.3). Toutefois, pendant l'hibernation et la reproduction (§ 2.4.3), la photopériode est ajustée périodiquement selon un calendrier, tel que celui fourni à l'annexe F (tableau F.1). En outre, une lumière rouge (p. ex. ampoule de 60 watts pour reptiles Nightlight Red^{MC} de Zoo Med) placée au-dessus d'une zone prévue pour se prélasser devrait rester allumée en permanence⁴³.

Pour les adultes, la moyenne quotidienne de la température ambiante dans l'installation de maintien devrait être de 20 ± 2 °C, et sa valeur instantanée de 20 ± 3 °C. Toutefois, pendant l'hibernation et la reproduction (§ 2.4.3), la température est ajustée périodiquement selon un calendrier, tel que celui fourni à l'annexe F (tableau F.1).

⁴³ Non seulement une lampe rouge pour amphibiens/reptiles fournit une zone chaude pour se prélasser, ce qui favorise la digestion, mais encore elle simule le clair de lune pendant les heures sombres de la photopériode.

Le maintien des adultes de *L. pipiens* est possible grâce à divers aliments vivants. En règle générale, les proies vivantes doivent être disponibles et aussi variées que possible (Mattison, 1993). Les vers de terre et les larves de ténébrion peuvent être achetés ou élevés en laboratoire, et les grillons peuvent être achetés dans une animalerie locale (LEEA, 2004, 2006, 2009). Il faudrait nourrir les grenouilles trois fois par semaine, et chaque distribution de nourriture devrait équivaloir à trois insectes par grenouille (c.-à-d. qu'on peut utiliser une combinaison de grillons et de vers). Les grillons et les vers devraient être légèrement saupoudrés d'un mélange 1:4 de vitamines (p. ex. Reptivite^{MC}) et de carbonate de calcium au moins deux fois par semaine avant d'être distribués aux grenouilles. Pendant l'alimentation des élevages, il faudrait enlever et éliminer toute vieille nourriture accompagnée de moisissure ou des champignons. Consulter l'annexe E pour plus de détails sur l'obtention et le maintien d'insectes pour nourrir les grenouilles adultes.

La surveillance de la dureté, du pH, de l'oxygène dissous, de l'aération et d'autres paramètres de l'eau utilisée pour maintenir les adultes de *L. pipiens* devrait se faire conformément à la description donnée au § 2.3.5. Pour les grenouilles adultes, il faudrait mesurer les températures de l'eau et de l'air ainsi que l'oxygène dissous et le pH de l'eau dans chaque réservoir au moins trois fois par semaine. Les niveaux d'ammoniac dans chaque réservoir d'élevage de grenouilles adultes devraient être mesurés au moins une fois par semaine. Une fois tous les deux mois et après toute mortalité, la mousse de chaque réservoir devrait être remplacée, et les plantes en plastique de chaque réservoir devraient être désinfectées. L'autre substrat terrestre dans chaque récipient de maintien des adultes devrait être nettoyé et désinfecté ou remplacé si nécessaire.

2.4.3 Hibernation et reproduction

Les indices environnementaux (c.-à-d. les ajustements de la température et de la photopériode) qui stimulent l'hibernation, le développement et la maturation des gonades ainsi que les changements physiologiques chez les grenouilles adultes qui aboutissent à la production de gamètes peuvent être simulés en laboratoire afin de prolonger l'approvisionnement potentiel en organismes d'essai au-delà de la période de reproduction saisonnière de

*L. pipiens*⁴⁴. La reproduction est induite par des injections d'hormones (agoniste de l'hormone de libération des gonadotrophines et chlorhydrate de métopropramide), les masses d'œufs fécondés sont collectées et les organismes sont élevés aux fins d'utilisation dans les essais. Les procédures d'hibernation et d'élevage en laboratoire de *L. pipiens* pour obtenir les organismes d'essai sont décrites à l'annexe F.

Pour simuler l'hibernation, les grenouilles mâles et femelles sont placées dans des réservoirs séparés dans des chambres à température et photopériode contrôlées, à moitié remplies d'eau d'élevage ou d'une solution de Ringer 1:20 avec un maximum de 6 grenouilles/20 L. Un plan précis de changements de température et de photopériode est suivi pour stimuler l'hibernation (v. l'annexe F.2). Pendant l'hibernation, les solutions devraient faire l'objet d'un renouvellement continu avec faible débit continu ou d'un renouvellement intermittent avec un remplacement quotidien de ≥ 50 % pendant les deux premières semaines et trois fois par semaine par la suite. Les grenouilles devraient être dérangées le moins possible pendant l'hibernation et la reproduction en laboratoire.

Il est recommandé de tenir des registres pour chaque adulte de *L. pipiens* en hibernation ou maintenu pour fournir des têtards à utiliser dans les essais de toxicité. Les registres devraient indiquer l'origine, le poids, la date de réception, les cas de maladie, les doses de médicaments et les dates (le cas échéant), ainsi que les tentatives de reproduction (y compris les détails relatifs à l'hibernation et aux injections d'hormones). Les individus peuvent être identifiés par des photographies des taches ou par un marquage (CCPA, 2021).

On devrait mesurer et consigner quotidiennement la température (de l'air et de l'eau) pendant l'hibernation. Pour chaque réservoir d'hibernation, il faudrait mesurer et consigner l'oxygène et le pH quotidiennement ou au moment du renouvellement

⁴⁴ Selon les rapports, dans des conditions naturelles, la croissance des ovocytes et le dépôt du vitellus commencent à la fin du printemps et au début de l'été, suivis par la maturation des œufs à l'automne et l'augmentation de leur taille en hiver, avec l'ovulation au cours de la saison de reproduction du printemps (Mizell, 1964).

en cas de renouvellement intermittent, ou au moins trois fois par semaine s'il s'agit d'un renouvellement continu. Chaque réservoir d'hibernation devrait être contrôlé quotidiennement pour détecter les cas de mortalité et les signes de stress ou de maladie. Le § 2.4.2 et l'annexe E fournissent de plus amples renseignements sur le maintien des grenouilles en hibernation et sur la production d'embryons par injection d'hormones.

Les grenouilles adultes femelles et mâles devant se reproduire peu après leur arrivée au laboratoire (c.-à-d. sans hibernation) sont maintenues dans des réservoirs séparés. Les grenouilles devraient être acclimatées, conservées et nourries comme il a été décrit précédemment (v. § 2.4.2 et annexe E).

Le protocole d'administration des hormones de reproduction, par injection intrapéritonéale, est décrit en détail à l'annexe F.3. Il s'agit d'une dose d'amorçage d'agoniste de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH-A) suivie d'une dose combinée de GNRH-A et de chlorhydrate de métopropramide (MET). Après les injections d'hormones, les grenouilles adultes sont transférées dans de grands réservoirs de reproduction couverts, dotés d'une petite surface terrestre et d'un substrat approprié pour la ponte (p. ex. des plantes en plastique), tel qu'il est décrit à l'annexe F. Le ratio recommandé de grenouilles mâles et femelles dans ces réservoirs de reproduction est de 3:2. Chaque réservoir de reproduction devrait être contrôlé quotidiennement, et tout cas d'amplexus ou de ponte devrait être consigné.

2.4.4 Santé, mise en quarantaine et maladies des grenouilles adultes

On devrait manipuler le moins possible les grenouilles adultes pour éviter de les blesser ou de les stresser inutilement. Le port de gants est obligatoire pour manipuler les grenouilles. On recommande de porter des gants rincés et exempts de poudre; par ailleurs, il ne faut pas utiliser de gants en latex sauf s'il a été prouvé qu'ils n'étaient pas toxiques pendant une étude en laboratoire (v. annexe E pour plus de détails). S'il faut les manipuler, il faudrait le faire doucement, soigneusement et rapidement, pour réduire au minimum le stress subi par les animaux. Chaque récipient contenant des grenouilles adultes devrait être contrôlé au moins trois fois par semaine (p. ex. avant la distribution de nourriture), période pendant

laquelle la santé des organismes doit être surveillée et consignée. Il est recommandé d'inspecter régulièrement le contenu de chaque récipient de maintien immédiatement avant chaque distribution de nourriture, pour déterminer l'état apparent des organismes et celui des réservoirs de maintien. Le bien-être de l'organisme devrait être évalué à ce moment-là (p. ex. les changements dans l'alimentation ou d'autres comportements, les interactions sociales telles que l'agression, et l'apparence telle que la couleur de la peau ou la desquamation excessive de la peau); des recommandations d'indicateurs de bien-être sont disponibles dans le § 9.1 des lignes directrices du CCPA pour les amphibiens (CCPA, 2021). Le nombre de grenouilles doit être compté et consigné, et tout organisme mort, malade ou moribond doit être compté et retiré de chaque réservoir. Si nécessaire, les grenouilles adultes peuvent être traitées pour prévenir ou contrôler les maladies en consultation avec un vétérinaire. Les registres relatifs aux maladies et au traitement des grenouilles adultes devraient être conservés. En cas de traitement des grenouilles adultes pour prévenir ou contrôler les maladies, il faudrait attendre au moins deux semaines avant de collecter les œufs des adultes pour les utiliser dans les essais de toxicité.

Les grenouilles adultes devraient être actives, de couleur verte à brune, et ne présenter aucun signe visible de maladie (p. ex. abrasions, rougeurs, desquamation de la peau, absence d'alimentation).

On devrait évaluer régulièrement et corriger au besoin les conditions et les modes opératoires utilisés pour le maintien de chaque élevage, afin de préserver ou de restaurer sa santé. Si l'élevage semble en mauvaise santé ou atypique pendant une vérification, on devrait le vérifier plus fréquemment, pour s'assurer qu'il n'y survient pas une mortalité en cascade (c.-à-d. que le taux de mortalité augmente exponentiellement en fonction du temps). Toute grenouille présentant des signes de maladie devrait être isolée, mise en quarantaine et traitée sur recommandation d'un vétérinaire (v. annexe E). On devrait consigner les dates et les doses de tout traitement administré pour chaque grenouille.

Les nouveaux lots de grenouilles adultes reçus par le laboratoire devraient être maintenus en quarantaine pendant au moins deux semaines, voire plus (six à huit semaines)⁴⁵. Les réservoirs doivent être séparés de tous les réservoirs de grenouilles que le laboratoire possède déjà (c.-à-d. de préférence, dans une pièce séparée). Il est interdit de transférer des grenouilles, de l'eau ou des matières d'un réservoir à l'autre. Il faudrait changer les gants après tout contact avec une grenouille potentiellement infectée, et tout le matériel devrait être désinfecté.

L'annexe E fournit des conseils sur le traitement prophylactique, l'échantillonnage fécal et la mise en quarantaine des grenouilles adultes, ainsi que des renseignements sur les maladies courantes chez *Lithobates pipiens*.

⁴⁵ On recommande une mise en quarantaine lorsque l'on reçoit un nouveau lot de grenouilles adultes, en particulier pour les laboratoires qui conservent déjà des amphibiens en interne, afin d'éviter le transfert de maladies entre les lots d'organismes. En outre, la mise en quarantaine peut aider à prévenir l'utilisation d'organismes malades dans les essais. Toutefois, si un laboratoire reçoit des grenouilles destinées à une reproduction immédiate ou à une hibernation immédiate suivie d'une reproduction, il peut choisir d'accepter le risque de maladie et de ne pas mettre en quarantaine le nouveau lot de grenouilles adultes.

Section 3

Système expérimental

3.1 Équipement et appareillage

On doit effectuer les essais dans une chambre climatique ou dans une installation équivalente, possédant des moyens acceptables de régulation de la température et de l'éclairage (v. § 4.3.3). Le laboratoire d'essais devrait être bien ventilé pour empêcher l'exposition du personnel à des émanations nocives et être isolé des causes physiques de perturbation ou de tout contaminant qui pourrait nuire aux organismes d'essai. Le local de préparation des substances ou des matières pour la préparation des essais devrait également comporter une hotte et être aéré convenablement.

Le laboratoire d'essais devrait être isolé de l'élevage d'embryons, de têtards et de grenouilles (v. § 2.3.3 et 2.3.4), pour éviter une éventuelle contamination. En outre, le laboratoire devrait être éloigné des lieux d'entreposage et de préparation des échantillons, pour prévenir une éventuelle contamination des récipients d'essai et de leur contenu par ces sources. D'après l'expérience des laboratoires canadiens, les têtards et les grenouilles adultes sont plus sensibles aux maladies que les vertébrés couramment utilisés, tels que *Pimephales promelas* (tête-de-boule) et *Oncorhynchus mykiss* (truite arc-en-ciel). Lorsque le personnel de laboratoire effectue des opérations de routine, il devrait changer de gants lorsqu'il passe d'une expérience à l'autre. On devrait nettoyer soigneusement les instruments et les surfaces entre chaque utilisation. Le système de ventilation devrait être conçu, inspecté et exploité de façon à empêcher l'air de l'intérieur du laboratoire de contaminer les installations d'élevage. L'air vicié des installations de manutention et d'entreposage des échantillons ou de traitement ou d'essai des produits chimiques ne devrait pas être dirigé vers les locaux d'essais du laboratoire.

Tout matériau pouvant entrer en contact avec les organismes, l'eau ou les récipients d'essai de cette installation doit être non toxique (v. § 2.3.2) et devrait se prêter le moins possible à la sorption de substances chimiques. On devrait utiliser chaque fois que c'est possible le verre borosilicaté, le nylon, le polyéthylène et le polycarbonate haute densité, les

plastiques fluorés, le Téflon^{MC}, le Nalgene^{MC}, la porcelaine, la fibre de verre et l'acier inoxydable 316 pour réduire au minimum la sorption et la désorption de substances. On doit éviter les matériaux toxiques, dont le cuivre, le zinc, le laiton, le métal galvanisé, le plomb et le caoutchouc naturel.

L'air comprimé utilisé dans le laboratoire d'essais pour aérer l'eau doit être exempt d'huile et d'émanations. Dans la mesure du possible, on devrait utiliser des pompes à air sans huile. Toute huile ou matière particulaire présente dans l'alimentation en air devrait être éliminée par des filtres, qui sont remplacés au fur et à mesure pour garantir leur efficacité.

Le laboratoire d'essais doit être doté des instruments nécessaires à la surveillance des variables de base de la qualité de l'eau (p. ex. la température, la conductivité, l'oxygène dissous, le pH) et doit être prêt à entreprendre une analyse rapide et fidèle d'autres variables telles que la dureté, l'alcalinité, l'ammoniac et le chlore résiduel (dans les cas où de l'eau municipale déchlorée ou sans chloramine est utilisée comme eau d'élevage ou témoin/de dilution). Il faut, lors de la préparation des *solutions mères* et/ou des substances ou matières d'essai, de l'équipement de protection, notamment des gants, des vêtements de laboratoire et des verres pour la protection des yeux.

Tous les récipients d'essai, tout l'équipement et toutes les fournitures qui pourraient entrer en contact avec les échantillons d'essai, l'eau témoin/de dilution, les solutions mères ou les solutions filles (d'essai) doivent être propres et avoir été rincés à l'eau témoin/de dilution, à l'eau *désionisée* ou à l'eau *distillée* avant usage. Après usage, on devrait laver tous les matériaux réutilisables. On recommande de procéder comme suit pour le nettoyage (EC, 2013a) :

1. Faire tremper dans l'eau du robinet (avec ou sans détergent) pendant 15 minutes, puis nettoyer à fond au détergent ou laver dans un lave-vaisselle automatique;

2. Rincer deux fois à l'eau du robinet;
3. Rincer soigneusement à l'acide nitrique (HNO₃) ou chlorhydrique (HCl) fraîchement préparé, dilué (10 %, v/v⁴⁶), garanti sans métal, pour supprimer le tartre, les métaux et les bases;
4. Rincer deux fois à l'eau désionisée (ou à une autre eau d'essai);
5. Rincer une fois à l'acétone non diluée, de qualité convenant à l'analyse des pesticides, pour éliminer les composés organiques, et à l'hexane de qualité « réactif » (p. ex. de qualité « CLHP », pure à 98,5 %, au moins) pour éliminer les résidus huileux (travailler sous hotte)⁴⁷;
6. Laisser le solvant organique se volatiliser de la verrerie sous la hotte et relaver la verrerie (en frottant au besoin) au détersif;
7. Rincer trois fois à l'eau désionisée (ou à toute autre eau équivalente).

Ce mode opératoire de nettoyage part du principe que l'on ne connaît pas l'identité des contaminants et permet donc de nettoyer correctement les contaminants métalliques et organiques. Si l'on connaît les contaminants (p. ex. le sel métallique), on peut abrégier le mode opératoire de nettoyage (p. ex. suppression des étapes 5 à 7).

3.2 Éclairage

Tous les récipients d'essai devraient recevoir un éclairage vertical direct à spectre continu (p. ex. fluorescent ou équivalent), avec une intensité suffisante pour fournir 100 à 500 lux à proximité de la surface de l'eau. L'éclairage devrait être aussi uniforme que possible pour tous les récipients d'essai. On doit régler la photopériode à 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. On recommande

⁴⁶ Pour préparer une solution d'acide à 10 %, ajouter soigneusement 10 mL d'acide concentré à 90 mL d'eau désionisée.

⁴⁷ Il **n'est pas** recommandé de rincer le plexiglas^{MC} ou tout équipement ou récipient en plastique à l'acétone ni à l'hexane, qui peuvent les attaquer, les piquer et les opacifier.

une période de transition de 15 à 30 minutes entre la lumière et l'obscurité (v. § 2.3.3 et note de bas de page 23).

3.3 Essais préliminaires et essais définitifs

3.3.1 Essais préliminaires

Il incombe au laboratoire de démontrer sa capacité à obtenir des résultats constants et précis à l'aide des méthodes d'essai décrites dans le présent document avant d'effectuer pour la première fois des essais de toxicité *définitifs*. Pour s'acquitter de cette responsabilité lorsqu'un laboratoire est novice dans l'emploi d'une méthode d'essai biologique, le personnel devrait réaliser au moins deux essais à concentrations multiples ou des essais à concentration unique (c.-à-d. un témoin positif) en utilisant un toxique de référence (v. § 4.8) et les méthodes définies au § 4 pour un essai définitif. En outre, si, dans le cadre de l'essai avec le toxique de référence, la durée ou l'exposition diffèrent de l'essai définitif prévu (p. ex. un essai de létalité aiguë après 96 h pour l'essai définitif de 14 jours, ou un témoin positif de 14 jours utilisant la thyroxine pour l'essai définitif de 42 jours), le personnel devrait effectuer au moins deux essais de 14 ou 42 jours en utilisant uniquement de l'eau témoin/de dilution et les méthodes définies au § 4 pour un essai définitif. Ces essais préliminaires sont recommandés afin de confirmer les performances acceptables des espèces retenues pour l'essai (*L. pipiens*) dans l'eau témoin/de dilution utilisée par ce laboratoire et dans les conditions et modes opératoires d'élevage et de maintien précisés dans le présent document (v. § 2.3). En outre, ces essais permettront au laboratoire d'établir les concentrations d'un toxique de référence à utiliser comme témoin positif et/ou dans un essai avec un toxique de référence à concentrations multiples (v. § 3.5 et 4.8).

Les conditions et modes opératoires de l'exécution de ces essais préliminaires devraient être identiques et conformes à ceux qui sont exposés au § 4. Chaque essai préliminaire devrait idéalement être réalisé en utilisant un lot différent d'organismes d'essai.

Les données relatives à la performance du témoin issues de ces essais préliminaires doivent montrer que les critères de validité (v. § 4.7) peuvent être respectés en utilisant l'eau témoin/de dilution destinée à être utilisée dans chacune des deux

options d'essai de toxicité définitif, en supposant que le laboratoire ait l'intention d'utiliser les deux options d'essai. On devrait examiner les données de ces essais préliminaires dans le but de choisir une concentration unique ou une série de concentrations à utiliser comme témoin positif ou comme toxique de référence à concentrations multiples, respectivement.

3.3.2 Essais définitifs

Les récipients d'essai qui seront utilisés dans les essais définitifs doivent être inertes aux substances d'essai et de référence ou aux mélanges de contaminants (en d'autres termes, ces substances ou mélanges ne devraient pas adhérer aux récipients d'essai ou réagir de quelque façon que ce soit avec les récipients). Les récipients doivent être assez grands pour contenir au moins 7 L d'eau témoin/de dilution ou de solution fille⁴⁸. On recommande d'utiliser des aquariums en verre. Chaque récipient doit être nettoyé soigneusement avant et après emploi; on devrait aussi le rincer à fond avec de l'eau désionisée, distillée ou témoin/de dilution avant de s'en servir (v. § 3.1). On peut recouvrir lâchement les récipients pour éviter que des débris (p. ex. la poussière de l'air du laboratoire) ne pénètrent dans le récipient d'essai.

Le renouvellement de chaque solution fille (au minimum trois fois par semaine) est réalisé soit en aspirant environ 80 % de la vieille solution et en la remplaçant immédiatement par une solution fille fraîche (nouvelle) (essai avec renouvellement intermittent), soit par l'ajout continu d'une solution fraîche dans l'enceinte d'essai (essai avec renouvellement continu). Le § 4.3.2 donne de l'information sur les systèmes d'essai à renouvellement continu. Il faudrait adapter le récipient d'essai aux conditions de renouvellement

⁴⁸ Au cours de l'étude interlaboratoire, les laboratoires participants ont utilisé des aquariums d'une capacité totale de 8 L ou 17 L. Le plan d'expérience a utilisé 6 L de solution d'exposition; cependant, dans certains laboratoires, au cours des dernières semaines de l'exposition de 42 jours, les niveaux d'ammoniac étaient légèrement élevés. Une densité de chargement de 10 têtards pour 7 L permettra de réguler l'augmentation des concentrations d'ammoniac, s'aligne bien sur les valeurs de la documentation, et est inférieure aux densités de chargement qui sont corrélées avec une augmentation de la mortalité témoin (Melvin et Houlahan, 2012; Environnement et Changement climatique Canada, 2023).

intermittent ou de renouvellement continu, en fonction des exigences et des objectifs de l'essai⁴⁹.

3.4 Eau témoin/de dilution

Selon le plan d'expérience et l'objectif de l'essai (v. § 5 et 6), l'eau témoin ou l'eau de dilution peut être : de l'eau souterraine ou de surface (d'un cours d'eau, d'une rivière ou d'un lac) « non contaminée »; de l'eau de laboratoire, du pH et de la dureté voulus (p. ex. simulant ceux de l'eau réceptrice); un échantillon d'eau réceptrice prélevé en amont de la source de contamination ou à proximité, mais à l'abri de son influence; ou de l'eau déchlorée ou sans chloramine de la municipalité (v. § 2.3.5). L'eau utilisée comme eau témoin/de dilution est souvent la même que celle utilisée pour le maintien ou l'élevage des têtards/grenouilles (v. § 2.3.5), bien qu'elle puisse provenir d'une autre source. Par exemple, l'utilisation d'eau réceptrice ou d'eau « en amont », ou d'eau de laboratoire ajustée au pH et à la dureté de l'eau d'un site de prélèvement, pourrait s'avérer un bon choix (v. § 6.3). La qualité de l'eau témoin/de dilution est extrêmement importante – on doit avoir démontré qu'elle permet des taux acceptables de survie, croissance et développement des organismes d'essai lors des essais préliminaires (v. § 3.3.1) avant d'être utilisée dans les essais de toxicité définitifs. Lorsque l'eau témoin/de dilution provient de l'eau de surface (y compris l'eau réceptrice ou « en amont »), il faut préparer un deuxième jeu de témoins avec l'eau du laboratoire qui a permis antérieurement à ce dernier d'obtenir des résultats valides⁵⁰. Si un échantillon

⁴⁹ Pour de nombreux types de substances d'essai, les essais en conditions statiques avec renouvellement des solutions filles après 12 ou 24 heures, s'ils sont effectués correctement, peuvent être aussi sensibles et précis que les essais avec renouvellement continu (Sprague, 1973). Des essais à renouvellements intermittents avec des renouvellements plus fréquents pourraient également être souhaitables ou nécessaires lorsque les produits de dégradation de la substance d'essai sont préoccupants. Une demande élevée chimique ou biochimique en oxygène, la volatilité ou l'instabilité de certaines substances pourraient nécessiter l'utilisation d'un essai avec renouvellement continu.

⁵⁰ Si l'essai a pour objet de mesurer à quel point une eau réceptrice ou d'« amont » donnée peut modifier la toxicité de la substance ou de la matière d'essai à cause de ses caractéristiques physicochimiques (p. ex. dureté, pH,

d'eau de surface contient des débris ou des organismes indigènes susceptibles d'être confondus avec les organismes d'essai ou de les attaquer, l'échantillon doit être filtré avant usage (v. § 2.3.5). L'utilisation d'une eau de surface peut présenter un risque important pour les amphibiens en raison de la présence d'organismes pathogènes⁵¹. Le risque est plus prononcé que pour les autres méthodes d'essai normalisées, car l'essai portant sur les amphibiens se déroule sur une plus longue période, et les maladies potentielles ont donc plus de temps pour se manifester. La taille des bactéries et des champignons qui provoquent des maladies chez les amphibiens (v. l'annexe E) est comprise entre 0,3 µm (*Aeromonas hydrophila*) et 800 µm, et celle des ranavirus est d'environ 150 nm. Il peut donc être souhaitable de filtrer l'eau de surface à utiliser comme eau témoin/de dilution au moyen d'un filtre à sable classique ou d'un filtre commercial en ligne (p. ex. de 0,45 à 5 µm). La stérilisation aux rayons ultraviolets est également recommandée pour réduire le risque d'agents pathogènes (v. § 2.3.5). Il convient de noter que la filtration seule peut ne pas atténuer le risque d'infection *Ranavirus* en raison de la petite taille des virus.

Avant l'emploi, il faut ajuster la température de l'eau témoin/de dilution en fonction de celle exigée pour l'essai (23 ± 2 °C). À cette température, la teneur en oxygène dissous de l'eau devrait être de 90-100 % de la valeur de saturation. Au besoin, on devrait aérer vigoureusement le volume exigé d'eau

turbidité) et/ou de la présence d'autres contaminants, le chercheur peut choisir d'utiliser de l'eau réceptrice ou d'« amont » comme eau témoin/de dilution. Une comparaison des témoins de cette eau et des témoins maintenus dans l'eau du laboratoire permettra de relever les effets toxiques susceptibles d'être attribuables à l'eau réceptrice ou d'« amont ». Pour mieux connaître l'influence de chaque type d'eau d'essai ou d'eau témoin/de dilution sur la toxicité de la substance ou de la matière d'essai, on peut comparer un à un les effets toxiques de chaque type d'eau utilisée pour préparer les traitements.

⁵¹ Par exemple, la prévalence de *Batrachochytrium dendrobatidis* (un champignon d'origine hydrique causant la maladie des chytrides; v. l'annexe E.2) dans les populations sauvages de *L. pipiens* a été observée à 18,6 % en Colombie-Britannique (Voordouw *et al.*, 2010), à 25 % sur l'Île-du-Prince-Édouard (Forzán *et al.*, 2010) et à 25,7 % dans le Maine (Longcore *et al.*, 2007).

(à l'air comprimé, exempt d'huile, traversant des pierres poreuses) immédiatement avant l'emploi et l'on devrait vérifier que la teneur en oxygène dissous atteint 90-100 % de la valeur de saturation. Le pH de l'eau devrait être mesuré et rester stable avant l'emploi.

3.5 Témoin positif

On recommande d'employer au moins un échantillon de témoin positif dans chaque essai de toxicité définitif décrit dans le présent document pour aider à l'interprétation des résultats des essais.

L'objectif est de sélectionner une ou deux concentrations d'un toxique de référence qui provoquera une réponse chez l'organisme d'essai (pour l'option d'essai choisie) qui est prévisible sur la base d'essais de toxicité antérieurs réalisés avec la même matière. Les échantillons de témoin positif sont de l'eau témoin/de dilution que l'on a enrichie d'un toxique de référence, pour lequel on possède et/ou on a établi en laboratoire des données sur sa toxicité pour *L. pipiens*, données rassemblées à la faveur de conditions expérimentales et des modes opératoires spécifiés. Ces échantillons de témoin positif constituent une solution de rechange aux essais avec un toxique référence à concentrations multiples traditionnellement requis dans les méthodes d'essai biologique d'Environnement et Changement climatique Canada. Pour chacune des deux options d'essai sur 14 et 42 jours décrites dans le présent document, il faut utiliser des concentrations d'un toxique de référence dans un essai à concentrations multiples distinct ou en tant que répétitions d'un témoin positif (à une ou deux concentrations données) pour évaluer la sensibilité des organismes d'essai ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire sur cette matière (v. § 4.8).

Section 4

Modes opératoires universels

Les conditions et les modes opératoires généraux décrits dans cette section à l'égard des essais de toxicité avec des larves de *Lithobates pipiens* s'appliquent à tous les essais portant sur des échantillons de *substance chimique*, de *produit chimique* ou d'eau contaminée. Ils s'appliquent également aux essais de toxicité de référence connexes. Dans la section 5, on expose des modes opératoires plus particuliers d'essais avec des substances ou des produits chimiques. Dans la section 6, on donne des conseils et on expose les modes opératoires précis permettant d'effectuer les essais avec des échantillons d'eau contaminée (p. ex. milieux humides touchés ou *eaux réceptrices*, *effluents*, *élutriats*, ou *lixiviats*). Dans ces modes opératoires universels, il faut intégrer tous les aspects du système expérimental décrit dans la section 3. Les conditions et modes opératoires décrits dans la section 2 à l'égard de l'élevage et de l'acclimatation de *L. pipiens*, en vue des essais de toxicité s'appliquent également. Le tableau 4 présente une liste de contrôle sommaire des conditions et modes opératoires exigés et recommandés, d'application universelle, pour chaque essai, ainsi que des conditions et modes opératoires recommandés pour l'essai de types précis de matières ou de substances.

Cette méthode d'essai biologique mesure les effets d'une exposition à diverses matières et substances sur la capacité de survie, la croissance et le développement des premiers stades de développement aquatiques des grenouilles. L'espèce retenue pour l'essai est *L. pipiens* (v. § 1.2). L'essai est réalisé dans des conditions statiques de renouvellement intermittent ou continu, et sa durée dépend des objectifs de l'étude et de l'option d'essai choisie (v. § 1.1, 2.1 et 4.3.1). Les têtards (à partir du stade 25 de Gosner) sont nourris à volonté avec un mélange 4:1 de chou fourrager et de nourriture commerciale séchée pour têtards trois jours par semaine, et avec des agglomérés ou mini gaufrettes d'algues séchées un jour par semaine. Les fréquences d'alimentation sont ajustées si nécessaire sur la base des observations de la nourriture restante.

La version définitive de la présente méthode a été appliquée et validée par plusieurs laboratoires au cours de trois séries d'essais parallèles avec *L. pipiens* (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b)⁵².

⁵² Quatre laboratoires ont participé à la première série d'essais de validation interlaboratoires. Deux essais dans des conditions statiques de renouvellement intermittent de 14 jours ont été réalisés par chaque laboratoire. Le premier essai consistait à exposer des têtards au stade 25 de Gosner à six concentrations de NaCl (de 0,80 à 6,0 g/L NaCl), et le second à exposer des têtards au stade 28/29 de Gosner à cinq concentrations de thyroxine (de 0,074 à 6,0 µg/L avec la T4) et à un solvant (NaOH). Pour les essais au NaCl, tous les laboratoires ont fait état d'une bonne survie des témoins, les moyennes des différents laboratoires allant de 82,5 à 100 %, et les têtards progressant d'environ 2 à 4 stades de Gosner (le SG moyen à la fin de l'essai variait de 27,3 à 29). Tous les laboratoires ont observé une diminution du taux de survie avec l'augmentation de la concentration de NaCl. La CL50 moyenne était de 4,2 g/L, avec des valeurs allant de 3,5 à 4,9 g/L. La variation interlaboratoire, exprimée sous forme de coefficient de variation (CV), était de 16 %. Des effets nocifs sur la croissance ont également été observés. La CI50 moyenne pour la biomasse était de 3,5 g/L NaCl et le CV était de 26 %. La CI50 calculée pour la longueur était >4 g/L NaCl, deux laboratoires affichant une réduction de 50 % de la longueur à 4 g/L NaCl (c.-à-d. CI50 = 4 g/L NaCl). Une diminution des stades de Gosner de 1,4 à 1,9 a été observée à la plus forte concentration de NaCl dans trois des quatre laboratoires (Nautilus Environmental, 2020a). Pour les essais avec la T4, un laboratoire a connu une épidémie touchant certaines de ses répétitions, qui ont été exclues des données résumées. Les trois laboratoires affichaient un taux de survie des témoins du solvant compris entre 83 et 100 %. À la fin de l'exposition de 14 jours, aucun effet n'a été observé sur la survie jusqu'à 2 µg/L de T4 et jusqu'à 6 µg/L de T4 dans deux laboratoires sur trois. La CI50 moyenne pour la diminution du poids humide était de 1,5 µg/L de T4, avec des valeurs allant de 1,4 à >2 µg/L de T4. Comme on pouvait s'y attendre compte tenu de son mode d'action, des concentrations plus élevées de T4 ont également entraîné un développement accru des têtards. Après deux semaines d'exposition, tous les têtards survivants à la concentration la plus élevée (6 µg/L) avaient atteint le SG 41 ou plus par rapport aux têtards du témoin du solvant dont le SG moyen à la fin de l'essai était compris entre 30,4 et 32,0. Un développement important des têtards a été observé dans un laboratoire à la

concentration d'essai la plus basse et dans les trois laboratoires à la concentration d'essai de 0,67 µg/L de T4 (Nautilus Environmental, 2020a).

Deux laboratoires ont participé à la deuxième série d'essais de validation interlaboratoires. Pour cette série, des têtards au SG 25 ont été exposés à six concentrations de triclosan (allant de 18,8 à 600 µg/L) et à un solvant (NaOH). L'essai devait se poursuivre jusqu'à ce que 60 à 80 % des têtards du groupe témoin atteignent le SG 42. L'un des laboratoires a dû interrompre l'essai prématurément (après 82 jours) en raison de l'apparition de symptômes de maladie et des mortalités connexes. Le second laboratoire a mis fin à l'essai après 105 jours. Jusqu'à la huitième semaine d'essai, les deux laboratoires affichaient des taux de survie élevés, tant dans l'eau de laboratoire que dans les témoins du solvant, avec des valeurs comprises entre 80 à 97 %. La concentration la plus élevée de triclosan testée (600 µg/L) s'est révélée létale, entraînant ainsi une mortalité totale dans les quatre jours suivant le début de l'essai. Les têtards restants n'ont pas présenté d'effets liés à la concentration pour aucun des paramètres, probablement en raison de la dégradation rapide du triclosan dans les concentrations d'exposition tout au long de l'essai. Le développement des têtards était très variable, certains atteignant le SG 42 en six semaines, alors que jusqu'à 32 % des autres têtards sont restés aux premiers stades du développement (SG 25 à SG 29) (Nautilus Environmental, 2020a). Ce taux de développement variable et, par conséquent, la durée longue et imprévisible des essais ont contribué à la décision d'Environnement et Changement climatique Canada de modifier le plan d'expérience pour déterminer les effets sur le développement, en passant d'un essai avec une fin basée sur le développement à un essai avec une durée d'exposition définitive.

Trois laboratoires ont participé à la troisième série d'essais de validation interlaboratoires. Pour cette dernière série, des têtards aux SG 28/29 ont été exposés à six concentrations de perchlorate (allant de 9,22 à 900 mg/L) pendant six semaines (42 jours). Tous les laboratoires ont présenté un bon taux de survie des témoins tout au long de l'exposition, avec un taux de survie compris entre 87 et 100 %. Les organismes témoins ont évolué du stade 6 à 11 de Gosner, la moyenne à la fin de l'essai étant comprise entre 34,3 et 39,6. Des effets nocifs dépendant de la dose ont été observés sur la croissance et le développement. Les paramètres de croissance se sont avérés les plus sensibles (c.-à-d. des CI50 plus faibles) lors des évaluations intermédiaires à 14 et 28 jours, avec des CI50 moyennes pour la biomasse de 185,2 et 208,6 mg/L, respectivement, et des CI50 moyennes pour la longueur de 61,8 et 178,0 mg/L, respectivement. Les CI50 moyennes pour la biomasse et la longueur à la fin de l'essai étaient de 270,4 et

4.1 Préparation des solutions d'essai

Chaque récipient d'essai (v. § 3.3.2) de l'installation d'essai doit être codé ou étiqueté clairement afin qu'on puisse identifier l'échantillon (et connaître sa concentration s'il est dilué). On devrait disposer les récipients d'essai de manière à faciliter les observations et les mesures, et on doit les répartir au hasard dans l'installation d'essai.

Pour tout essai visant à estimer la *CL50* ou une autre *CLp* pour la survie (v. § 4.6.2.1), à estimer les *CIp* pour les paramètres de croissance (c.-à-d. la longueur totale, le poids humide et la *biomasse*; v. § 4.6.2.2) ainsi qu'à détecter les effets significatifs sur le développement (c.-à-d. l'évolution du stade de Gosner à certaines concentrations par rapport au témoin ou aux témoins à la fin de l'essai; v. § 4.6.2.3), on doit préparer au moins sept concentrations d'essai plus une solution témoin (100 % d'eau de dilution); toutefois, on recommande d'en préparer davantage (c'est-à-dire ≥ 8 plus un ou des traitements témoins) pour améliorer la probabilité d'encadrer chaque paramètre⁵³.

244,2 mg/L respectivement. La variation interlaboratoire de ces paramètres, exprimée sous forme de CV, était comprise entre 37,6 % et 84,1 %. Des diminutions statistiquement significatives du développement des têtards (selon le stade de Gosner) ont été observées pour toutes les concentrations d'essai sauf la plus faible (9,21 mg/L de perchlorate) à la fin de l'exposition de 42 jours (Nautilus Environmental, 2020b).

Deux études pilotes au cours desquelles des têtards au SG 28/29 ont été exposés à une seule concentration de T4 (0,67 µg/L) lors des deuxième et troisième séries de l'étude interlaboratoire ont donné des résultats semblables. Les laboratoires participant aux deux séries ont démontré une accélération très constante du développement des têtards (c.-à-d. 5,0 et 4,9 stades, par rapport aux témoins) après deux semaines d'exposition. Ces résultats concordent avec le développement accéléré des têtards de 4,6 stades de Gosner par rapport aux témoins, observé à la même concentration d'exposition (0,67 µg/L de T4) lors de la première série d'essais interlaboratoires (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b).

⁵³ On recommande d'utiliser ≥ 8 concentrations d'essai plus la ou les solutions témoins afin d'améliorer la probabilité d'atteindre chaque paramètre recherché et de permettre le calcul des *CIp* pour la croissance à l'aide d'analyses de régression ainsi que la détection d'effets

Dans certains cas, on peut utiliser six concentrations d'essai. Par exemple, le chercheur peut avoir effectué un *essai préliminaire* avant de commencer l'*essai définitif*, et ces données peuvent être utilisées pour choisir les concentrations d'essai. On doit consigner et signaler toute réduction du nombre de concentrations d'essai et l'accompagner de la justification appropriée.

Il faudrait choisir une vaste gamme de concentrations, dont une faible concentration n'ayant aucun effet néfaste (comme c'est le cas avec le traitement *témoin négatif*) et une concentration élevée pour laquelle l'effet est « total » ou grave.

Si la concentration anticipée correspondant à l'effet à mesurer est encadrée par une série de concentrations très rapprochées, elles peuvent toutes se révéler soit trop faibles, soit trop fortes.

Pour conserver le large intervalle de concentrations et, également, pour obtenir les importants effets médians, on pourrait devoir utiliser des variantes expérimentales supplémentaires pour subdiviser plus finement l'intervalle choisi.

Lorsque l'incertitude entourant la toxicité d'un échantillon est appréciable, il est utile d'effectuer un essai préliminaire (essai de détermination de l'ordre grandeur) dans le seul but de choisir les concentrations pour l'essai définitif. Les conditions et les modes opératoires pour la réalisation d'un essai peuvent être assouplis. Un essai préliminaire couvre normalement une gamme de concentrations plus importante, comprend moins de répétitions (1 ou 2) et d'organismes, et peut être de plus courte durée⁵⁴.

significatifs sur le développement des têtards. Le grand nombre de variantes expérimentales est nécessaire afin de mieux mettre en évidence la forme de la relation concentration-réponse et choisir le modèle de régression linéaire ou non linéaire qui convient (v. § 4.6.2.2).

⁵⁴ La conception d'un essai préliminaire dépend des objectifs de l'étude, de l'option d'essai choisie et de la disponibilité des organismes d'essai, tout en gardant à l'esprit l'équilibre entre l'obtention de l'information nécessaire et les aspects pratiques et éthiques de l'utilisation d'organismes d'essai pour réaliser un essai préliminaire. Les masses d'œufs maintenues en laboratoire à des températures plus fraîches (p. ex. de 10 à 15 °C) retarderont le début du développement embryonnaire (v. § 2.3.4), ce qui permettra d'utiliser une

Il faudrait utiliser une série de dilutions géométriques dans laquelle chaque concentration successive représente environ 50 % de la précédente (p. ex. 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,1, 1,6). On peut également choisir les concentrations d'essai dans d'autres séries de dilution appropriées (p. ex. 100, 75, 56, 42, 32, 24, 18, 13, 10, 7,5; v. colonne 7 de l'annexe H). Si un taux élevé de mortalité est observé au cours des premiers jours de l'essai et que des organismes supplémentaires sont disponibles, des dilutions supplémentaires (c.-à-d. à des concentrations plus faibles) peuvent être ajoutées, et ces organismes sont exposés pendant le reste de la durée de l'essai. On ne recommande pas d'utiliser un facteur de dilution aussi faible que 30 % (p. ex. concentrations de 100, 30, 9) pour une utilisation de routine en raison de la faible précision de l'estimation de la toxicité; toutefois, il pourrait être utilisé en cas de grande incertitude quant à la gamme de concentrations susceptibles d'être toxiques. On trouvera dans EC (2005) de plus amples indications sur le choix des concentrations d'essai aux fins de la présente méthode. Les besoins en matière de volume pour les essais varient en fonction de l'option d'essai (14 ou 42 jours) utilisée (v. § 4.3.1, 5.2, 5.3 et 6.1).

Tant pour les essais à concentrations multiples que pour les essais à concentration unique, chaque variante expérimentale, y compris le ou les témoins, doit comprendre plusieurs répétitions. Le nombre de répétitions varie en fonction de l'option d'essai (14 ou 42 jours) et du type (concentrations multiples ou concentration unique) utilisés (v. § 4.2 et 4.6).

partie de la masse d'œufs pour fournir des organismes d'essai pour un essai préliminaire avant d'effectuer l'essai définitif. Les options pour les essais préliminaires peuvent inclure un essai de létalité de 96 heures, une exposition de 14 jours qui commence par de jeunes têtards (en utilisant une partie des organismes d'essai qui seront utilisés dans l'essai définitif), ou encore un essai complet sur une masse d'œufs supplémentaire réalisé avant l'essai définitif. Pour réduire le nombre d'organismes d'essai, il est possible d'utiliser moins de répétitions et de concentrations d'essai. On pourrait également utiliser un essai de létalité aiguë après 96 heures pour les poissons en remplacement de l'essai de 14 jours décrit dans la présente méthode, puisqu'il a été démontré qu'en cas d'exposition aiguë, les poissons peuvent avoir des sensibilités semblables à celles des larves d'amphibiens (v. § 1.3.1).

Tableau 4. Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés et exigés pour les essais de toxicité sur des grenouilles selon leurs stades de développement aquatiques

Type d'essai	<ul style="list-style-type: none"> – Renouvellement continu ou intermittent* – Les options pour la durée de l'essai sont les suivantes : <ul style="list-style-type: none"> ○ Essai de 14 jours : commence par des têtards (stade 25 de Gosner) et se termine après 14 jours d'exposition. ○ Essai de 42 jours : commence par des têtards (stade 28/29 de Gosner) et se termine après 42 jours d'exposition.
Eau témoin/de dilution	– Eau souterraine ou de surface propre, ou eau municipale déchlorée ou sans chloramine (dureté de 10 à 230 mg/l sous forme de CaCO ₃); eau d'« amont » ou eau réceptrice pour évaluer l'impact toxique à un endroit précis**; teneur en oxygène dissous de 90 à 100 % de saturation au moment de l'utilisation dans un essai; pH de 6,5 à 8,5.
Organismes	– Têtards de <i>Lithobates pipiens</i> (anciennement <i>Rana pipiens</i> ; grenouille léopard) (stade 25 de Gosner pour l'essai de 14 jours, et stade 28/29 de Gosner pour l'essai de 42 jours); ≥10 organismes par récipient d'essai.
Manipulation des organismes	– Petite épuisette ou petit gobelet utilisé pour transférer les têtards; veiller à ne pas toucher les têtards; à la fin de l'essai, les animaux sont retirés délicatement à l'aide d'une épuisette et humainement euthanasiés (p. ex. transfert dans une solution de méthanesulfonate de tricaine tamponnée de qualité vétérinaire [MS-222]).
Plan d'expérience	<ul style="list-style-type: none"> – Pour les essais à concentrations multiples : au moins 3 répétitions requises (4 recommandées) pour l'essai de 14 jours; au moins 4 répétitions par variante expérimentale et 8 répétitions pour le ou les témoins requises pour l'essai de 42 jours. – Pour les essais à concentration unique : nombre de répétitions à déterminer en fonction des objectifs du projet.
Récipient d'essai et solution	– Aquariums en verre ou autres récipients appropriés, contenant ≥7 L de solution fille ou témoin; les récipients peuvent être couverts pour éviter la contamination ou les débris.
Nombre de concentrations d'essai	– ≥ 7, plus le ou les témoins; davantage d'essais sont recommandés (c.-à-d. 8), plus le ou les témoins.
Renouvellement de la solution fille	– Au moins 3 fois par semaine pendant des jours non consécutifs (p. ex. lundi, mercredi et vendredi); en cas de renouvellement intermittent, éliminer 80 % de l'eau sus-jacente à l'aide d'un siphon (enlever les déchets/les débris du réservoir si nécessaire); remplacer la solution fille avec le moins d'agitation possible; en cas de renouvellement continu, recommander un débit qui renouvelle complètement la solution d'essai au moins 3 fois par semaine.
Température	– Moyenne journalière de 23 ± 2 °C, recommandation de 23 ± 1 °C; température instantanée de 23 ± 3 °C.
Oxygène/aération	– Si la teneur en oxygène dissous est < 60 % ou > 100 % de saturation en air, aérer au préalable les solutions filles pendant 30 minutes (p. ex. 6,5 ± 1 mL/min-L); si nécessaire, poursuivre l'aération préalable jusqu'à l'obtention d'une saturation de 60 à 100 % ou pendant encore 90 minutes au maximum; une légère aération continue (p. ex. 6,5 ± 1 mL/min-L) est assurée pendant toute la durée de l'essai (obligatoire pour le renouvellement intermittent, facultatif pour le renouvellement continu).
pH	– Aucun réglage si le pH des solutions d'essai est dans l'intervalle 6,0 et 8,5***; un deuxième essai, dans un milieu au pH ajusté, pourrait être nécessaire ou convenable, si le pH de départ est à l'extérieur de cet intervalle.

Éclairage	<ul style="list-style-type: none"> – Éclairage vertical à spectre continu (fluorescent, incandescent ou à DEL); intensité ≥ 100 lux, éclairage recommandé de 100 à 500 lux à la surface de la solution d'essai; normalement 16 heures de lumière : 8 heures d'obscurité; transition graduelle recommandée.
Alimentation	<ul style="list-style-type: none"> – Distribution à volonté (le tableau 5 du § 4.3.6 fournit des exemples de fréquences d'alimentation); nourrir les têtards trois fois par semaine, au cours de jours non consécutifs, avec un mélange 4:1 (bouillie) de chou fourrager et de nourriture séchée pour têtards; nourrir les têtards avec des agglomérés d'algues séchées un jour par semaine en tant que quatrième distribution de nourriture; les taux d'alimentation sont ajustés si nécessaire sur la base des observations de la nourriture restante dans le témoin de l'eau de dilution.
Durée	<ul style="list-style-type: none"> – La durée dépend de l'option d'essai choisie : 14 ou 42 jours.
Observations	<ul style="list-style-type: none"> – Observations initiales : poids humide individuel, longueur totale et (éventuellement) longueur du museau-cloaque pour 20 organismes représentatifs au stade de développement approprié. – Observations quotidiennes : consigner toute apparence (p. ex. anomalies) ou tout comportement inhabituels, ainsi que le stade de développement approximatif et la mortalité; les organismes morts ou ceux qui atteignent le SG 42 avant la fin de l'essai doivent être retirés. – Nombre et pourcentage de têtards/spécimens métamorphes survivants, longueur totale, poids humide individuel, biomasse basée sur le poids humide, stade de développement et apparition de malformations ou développement asynchrone à la fin de l'essai; des mesures provisoires non destructives tous les 14 jours sont recommandées pour l'essai de 42 jours.
Mesures de la qualité de l'eau	<ul style="list-style-type: none"> – Température quotidienne ou continue; oxygène dissous et pH au début et à la fin de l'essai et au moins trois fois par semaine dans une répétition de variantes expérimentales représentatives (concentrations d'essai faibles, moyennes et élevées, au minimum, et témoins), avant et après chaque renouvellement de la solution; ammoniac au début et à la fin de l'essai dans une répétition de variantes expérimentales représentatives (concentrations d'essai minimales, médianes et maximales, et témoins), et une fois par semaine avant et après le renouvellement de la solution; recommander une mesure de la conductivité au début de l'essai et à chaque renouvellement de la solution d'essai (nouvelle solution uniquement) dans les variantes expérimentales représentatives; recommander une mesure de la dureté et/ou de l'alcalinité de l'eau témoin/de dilution et de la concentration d'essai la plus élevée au début de l'essai et une fois par semaine.
Paramètres	<ul style="list-style-type: none"> – Pourcentage moyen (\pm écart-type) de survie et de croissance (longueur totale, poids humide et biomasse basée sur le poids humide, tous corrigés en fonction des mesures initiales); stade de développement moyen (stade de Gosner). – Si l'essai porte sur plusieurs concentrations, on calcule la CLp pour la survie et la CIp pour les paramètres de croissance; pour l'essai de 42 jours, on détermine la différence significative entre les variantes expérimentales et le témoin en termes de stade de développement. – Les paramètres supplémentaires facultatifs comprennent la longueur du museau-cloaque, l'histologie des tissus ou des organes et l'analyse de l'expression génétique.
Essai avec un toxique de référence	<ul style="list-style-type: none"> – Un essai de toxicité de référence est réalisé pour chaque lot d'organismes d'essai utilisé dans un essai de toxicité définitif; plusieurs options acceptables pour les essais de toxicité de référence (v. § 4.8), y compris des essais à concentration unique et à concentrations multiples, en fonction de l'option d'essai utilisée pour les essais définitifs; on recommande le chlorure de sodium et/ou la thyroxine.

- Validité de l'essai
- Pour l'essai de 14 jours : essai non valide si la mortalité moyenne des organismes témoins est de > 20 %; essai non valide si le stade de Gosner moyen des organismes témoins est de < 27.
 - Pour l'essai de 42 jours : essai non valide si la mortalité moyenne des organismes témoins est de > 20 %; essai non valide si le stade de Gosner moyen des organismes témoins est de < 33.

- Paramètres de croissance pour les organismes témoins
- Pour l'essai de 14 jours : $\geq 14,4$ mm de longueur totale moyenne corrigée; $\geq 4,2$ mm de longueur moyenne corrigée du museau-cloaque; $\geq 0,18$ g de poids humide moyen corrigé; $\geq 0,16$ g de biomasse moyenne corrigée (sur la base du poids humide).
 - Pour l'essai de 42 jours : $\geq 13,2$ mm de longueur totale moyenne corrigée; $\geq 4,8$ mm de longueur moyenne corrigée du museau-cloaque; $\geq 0,44$ g de poids humide moyen corrigé; $\geq 0,42$ g de biomasse moyenne corrigée (sur la base du poids humide).

Produits chimiques

- Caractérisation de la substance ou du produit chimique
- On devrait connaître au préalable les données sur les principes actifs, l'hydrosolubilité, la pression de vapeur, la stabilité, les constantes de dissociation, les coefficients d'adsorption, la toxicité pour l'humain et les organismes aquatiques, ainsi que la biodégradabilité des substances ou produits chimiques ajoutés à l'eau; on recommande d'inclure dans les renseignements supplémentaires la formule structurale, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés significatives, la présence et les quantités d'additifs et le coefficient de partage *n*-octanol:eau.

- Solvants
- L'eau de laboratoire non contaminée ou désionisée est le solvant privilégié; si un autre solvant est utilisé, la concentration maximale est de 0,1 mL/L ou 100 mg/L (v. § 5.2), et l'essai doit comprendre un témoin du solvant contenant la même concentration d'agent solubilisant que dans la solution la plus concentrée de la substance chimique d'essai, en plus d'un témoin de l'eau de dilution.

- Concentration
- Les mesures recommandées se font au début et à la fin de l'essai pour les concentrations minimales, médianes et maximales, ainsi que pour les témoins; au début et à la fin de la période de renouvellement, si nécessaire; si la concentration diminue de ≥ 20 %, et en fonction des objectifs de l'étude, refaire l'essai avec des renouvellements plus fréquents ou des méthodes de renouvellement continu.

- Eau témoin/de dilution
- Selon les indications données ou l'objet de l'essai; eau réceptrice si l'on est préoccupé par l'impact toxique local; sinon, eau non contaminée du laboratoire qui a démontré qu'elle répondait aux critères de validité de l'essai.

Eaux contaminées

- Besoin en échantillons
- Soit plusieurs sous-échantillons provenant d'un seul échantillonnage, soit plusieurs échantillons distincts prélevés (ou préparés, s'il s'agit d'un éluatriat) et manipulés selon les indications du § 6.1; environ 150 L pour l'essai à concentration unique de 14 jours et l'analyse de routine des échantillons, et davantage pour les essais à concentrations multiples ou les essais de 42 jours (v. § 6).

- Transport et entreposage
- Si la température de l'échantillon est de > 7 °C, refroidir celui-ci entre 1 et 7 °C (avec de la glace ou des blocs réfrigérants); transport dans l'obscurité entre 1 °C et 7 °C (de préférence à 4 ± 2 °C); entreposage dans l'obscurité à 4 ± 2 °C; les échantillons ne doivent pas geler ou être partiellement gelés pendant le transport ou l'entreposage; la durée de conservation doit être réduite autant que possible.

Eau témoin/de dilution – Selon les indications données ou l’objet de l’essai; eau du laboratoire qui a démontré qu’elle répondait aux critères de validité des essais ou eau réceptrice d’« amont »** pour la surveillance et l’assainissement.

Les renseignements contenus dans ce tableau ne sont qu’un résumé. Les exigences et recommandations définitives de cette méthode d’essai figurent dans le corps du présent document.

* Des situations particulières (p. ex. des substances chimiques volatiles ou instables dans la solution) pourraient nécessiter l’utilisation d’un essai à renouvellement continu.

** Pour cette option, on doit préparer un témoin supplémentaire en utilisant une source d’eau distincte (naturelle, municipale déchlorée ou sans chloramine, ou reconstituée) qui a permis au laboratoire d’essai d’obtenir régulièrement des résultats valides lors d’essais chroniques antérieurs avec *L. pipiens*.

*** Si le pH se situe en dehors de cette plage, les résultats pourraient refléter une toxicité due à un pH biologiquement défavorable.

Pour chaque essai définitif, on doit préparer une ou des solutions témoins en même temps que les variantes expérimentales. Toute eau de dilution utilisée pour préparer les concentrations d’essai doit également servir à préparer une série de témoins. Chaque solution d’essai doit être bien mélangée avec une baguette de verre, un agitateur en Téflon^{MC} ou un autre dispositif fait d’un matériau non toxique. On doit ajuster les températures au besoin à 23 ± 2 °C. L’oxygène dissous et le pH des concentrations d’essai représentatives doivent être mesurés et consignés (v. § 4.4). Il pourrait être nécessaire d’ajuster le pH de l’échantillon de matière d’essai ou de la solution d’essai (v. § 4.3.5), ou de procéder à une aération préliminaire des solutions d’essai (v. § 4.3.4). Il faudrait mesurer la conductivité des solutions d’essai avant de les répartir dans les récipients d’essai, car cela permet de vérifier la préparation adéquate des concentrations d’essai (v. § 4.4).

Lorsqu’on utilise l’eau réceptrice en amont du point de rejet comme eau témoin/de dilution (v. § 5.3 et 6.3), il faut préparer une deuxième solution témoin avec l’eau du laboratoire qui a permis antérieurement à ce dernier d’obtenir des résultats valides lors d’un essai définitif (v. § 3.4).

Après l’ajout d’un volume mesuré de solution d’essai dans chaque récipient d’essai (c.-à-d. ≥ 7 L pour 10 organismes d’essai; v. § 3.3.2), on doit procéder à une légère aération pendant toute la durée de l’essai. Une aération préalable (30 minutes à un taux de $6,5 \pm 1$ mL/min-L) peut être prévue, en fonction des niveaux d’oxygène dissous (v. § 4.3.4). Il faut mesurer et consigner la température, l’oxygène dissous et le pH d’une répétition de chaque variante expérimentale après toute aération

préalable, mais avant l’ajout d’organismes dans les récipients d’essai.

4.2 Début de l’essai

La première journée d’exposition des animaux aux échantillons de matières ou de substances d’essai est appelée jour 0. Il faut ajouter au moins dix organismes par répétition, avec un nombre égal dans chaque récipient. Dans le cas de l’essai de 14 jours à concentrations multiples, il faut préparer trois répétitions par variante expérimentale (concentration), y compris les concentrations témoins, dans chaque essai, avec une recommandation de quatre répétitions par variante expérimentale. Dans le cas de l’essai de 42 jours à concentrations multiples, il faut préparer au moins quatre répétitions par variante expérimentale (concentration) et au moins huit répétitions pour les concentrations témoins dans chaque essai⁵⁵.

Pour les essais à concentration unique (p. ex. échantillon soumis à une concentration de 100 % seulement, ou à une concentration particulière d’une substance chimique d’essai), il faut utiliser au moins

⁵⁵ Il faut préparer au moins trois répétitions pour les estimations ponctuelles de la Clp en tant que paramètre. Pour le paramètre du stade de développement, le calcul de la puissance (v. § 4.6.2.4) a indiqué la nécessité d’un plan d’expérience inégal avec huit répétitions par témoin et quatre répétitions par variante expérimentale pour permettre un calcul suffisant (80 %) afin de détecter des effets significatifs de la concentration sur le stade de Gosner (Green, 2021). Ce plan d’expérience inégal est également utilisé dans la méthode d’essai LAGDA de l’EPA des États-Unis (2015), qui recommande des statistiques semblables pour le paramètre du développement (v. § 1.4 et 4.6.2.3).

huit récipients d'essai (répétitions) par variante expérimentale pour les options d'essai de 14 et 42 jours.

Un essai comportant sept concentrations plus un témoin et trois répétitions par variante expérimentale (concentration) nécessite au moins 240 organismes d'essai. On peut prélever un nombre supérieur à celui requis pour l'essai dans les récipients de maintien et d'acclimatation dans un grand récipient propre (p. ex. un seau) contenant de l'eau d'élevage à l'aide d'un petit filet à poissons. Les têtards devraient être évalués, puis comptés dans une série de petits béchers ou récipients de maintien contenant >1 L d'eau de dilution. Pour commencer l'essai, on doit utiliser des têtards au SG 25 ou SG 28/29, selon l'option d'essai choisie. L'évaluation du stade de développement (c.-à-d. le stade de Gosner) de chaque organisme d'essai avant son introduction dans le récipient d'essai doit être effectuée à l'aide d'un microscope à dissection. Pour y arriver, il suffit de placer délicatement un têtard dans une boîte de Petri, en veillant à ce qu'il y ait juste assez d'eau pour le recouvrir. En orientant le têtard de façon à obtenir une vue latérale, le stade de Gosner devrait être évalué sur la base de repères physiques précis (v. § 2.1 et 2.2, et la note de bas de page 68 du § 4.5). Les têtards qui ont pu être endommagés ou blessés lors de l'évaluation du stade de Gosner ou lors du transfert doivent être mis de côté. Les têtards qui semblent présenter des caractéristiques anormales (p. ex. des défauts visibles ou des corps endommagés, ou qui sont inactifs) ne doivent pas être retenus pour l'essai. Après avoir collecté et évalué un nombre suffisant d'organismes au stade de développement approprié, il faut les répartir au hasard dans chaque récipient d'essai. Vingt organismes supplémentaires au stade de développement approprié, représentatifs (visuellement) de ceux utilisés dans l'exposition, sont ensuite sélectionnés, euthanasiés et mesurés pour déterminer le poids humide, la longueur totale et, éventuellement, la longueur du museau-cloaque. La longueur totale (du bout du museau à l'extrémité de la queue) de chaque têtard doit être mesurée à l'aide d'une règle, d'un pied à coulisse ou d'une image numérique. En utilisant les mêmes outils de mesure, la longueur du museau-cloaque (du bout du museau au cloaque) peut également être mesurée. Après avoir épongé l'excès d'eau du têtard, le poids humide de chaque têtard doit être mesuré. Le stade de développement, la longueur et le poids des têtards

sont consignés et servent de mesures initiales pour l'essai. Des épauettes ou de petites cuillères en plastique peuvent être utilisées pour transférer les organismes d'essai dans des récipients temporaires, puis dans les récipients d'essai (v. § 3.3.2).

Les têtards utilisés dans un essai donné devraient idéalement tous provenir de la même masse d'œufs (c.-à-d. le lot). Toutefois, si le nombre d'organismes disponibles dans une seule masse d'œufs est insuffisant, si plusieurs masses d'œufs peuvent être utilisées, si la santé des organismes est préoccupante (v. note de bas de page 41 du § 2.3.8) ou si les objectifs de l'étude incluent la représentation d'une plus grande gamme de diversité génétique, on peut alors prélever les organismes dans plus d'une masse d'œufs. Dans ce cas, les organismes d'essai devraient être représentés de manière à peu près égale dans chaque masse d'œufs⁵⁶. Par ailleurs, si on peut utiliser plusieurs masses d'œufs, les chercheurs peuvent choisir la « meilleure » masse d'œufs sur la base des critères de surveillance et de santé recueillis pendant l'éclosion (v. § 2.3.8).

Après avoir transféré les organismes d'essai dans chaque récipient d'essai, il faudrait recompter le nombre de têtards pour s'assurer de la présence du nombre exigé et apporter tous les correctifs nécessaires. Les observations finales de tous les

⁵⁶ On doit essayer « d'homogénéiser les unités expérimentales », pour éviter, entre les récipients, tout écart qui serait relié à des différences de sensibilité entre les lots de têtards. On peut y parvenir de deux manières différentes (professeur J. Hubert, Département des mathématiques et des statistiques de l'Université de Guelph, communication personnelle, 1991; EC, 1998, 2011). Dans la première méthode, on peut réunir les têtards provenant de différentes masses d'œufs qui ont été gardés séparés, avant leur introduction dans les récipients d'essai. Dans la seconde méthode, on peut répartir de façon égale les têtards d'une masse d'œufs donnée entre toutes les répétitions de toutes les concentrations, puis répartir de même les têtards d'une autre masse d'œufs entre toutes les enceintes d'incubation ou tous les récipients d'essai pour constituer l'effectif complet de la répétition. La seconde méthode exige plus de soins et d'efforts d'élevage et de manipulation. Elle devrait cependant réduire le « bruit » des variations entre les répétitions de la même concentration et prévenir le risque, auquel est exposée la première méthode, d'obtenir de fortes proportions d'organismes d'essai insensibles ou très sensibles dans un récipient particulier, dans l'éventualité d'une telle fluctuation reliée au frai.

têtards dans chaque récipient d'essai devraient également alors être effectuées et on doit mettre au rebut et remplacer tout têtard à la taille, à la forme ou à la couleur atypiques. Il faut consigner la date et l'heure du début de l'essai, soit directement sur les étiquettes, soit sur des feuilles de données distinctes réservées à l'essai.

4.3 Conditions expérimentales et modes opératoires

4.3.1 Options d'essai

En fonction des objectifs de l'étude (v. § 1.1), on peut utiliser au moins une des deux options suivantes : i) un essai de 14 jours, qui commence par des têtards nageant librement (stade 25 de Gosner), conçu principalement pour évaluer la capacité de survie et la croissance des têtards avant tout changement métamorphique; ii) un essai de 42 jours, qui commence par des têtards à des stades de développement plus avancés (stade 28/29 de Gosner), conçu pour saisir les changements dans le développement et la croissance menant à la métamorphose.

Les plans d'expérience pour les essais à concentrations multiples sont fournis en détail, sur la base d'une vaste expérience en laboratoire, de la puissance statistique et du meilleur jugement scientifique. L'analyse des essais à concentration unique nécessiterait des tests d'hypothèse pour chaque paramètre biologique (développement, croissance, mortalité). Il est impossible d'optimiser le nombre de répétitions pour tous les paramètres biologiques⁵⁷. Si des essais à concentration unique s'avèrent nécessaires, les chercheurs sont encouragés à suivre toutes les étapes décrites pour un essai à

⁵⁷ Par exemple, afin d'avoir une puissance suffisante pour détecter les différences de poids humide, environ six répétitions seraient nécessaires si l'on utilisait un essai. Cependant, l'utilisation de six répétitions pour évaluer la mortalité pourrait conduire à un essai trop sensible, et une mortalité de 15-20 % serait donc jugée statistiquement significative (L. Van der Vliet, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa [Ontario], communication personnelle, 2022). Ce niveau de mortalité est admissible dans les témoins et s'inscrit donc dans les limites de l'erreur expérimentale. Toutefois, avec un résultat statistiquement significatif, les chercheurs peuvent conclure à tort que le résultat est biologiquement significatif.

concentrations multiples, tout en revoyant le nombre de répétitions en fonction des objectifs de l'étude.

On peut retenir les options d'essai de 14 jours et de 42 jours pour évaluer des échantillons de substance chimique ou d'eau contaminée, en fonction de l'objectif de l'essai. La survie (% de mortalité), la croissance (longueur totale, poids humide et biomasse) et le stade de développement (stade de Gosner) doivent être mesurés à la fin de l'essai pour les deux options d'essai. Les organismes d'essai déformés doivent également être observés et faire l'objet d'un rapport (v. note de bas de page 75 du § 4.6.1). La longueur du museau-cloaque peut également être mesurée à la fin de l'essai.

4.3.2 Type d'essai et renouvellement des solutions

Les essais peuvent se dérouler avec renouvellement intermittent ou continu des solutions. Avec certaines substances exerçant une forte demande chimique en oxygène (DCO) ou une forte demande biochimique en oxygène (DBO), ou encore, qui sont instables, il pourrait être nécessaire de renouveler en continu (rapidement) les solutions.

Dans les essais à renouvellement intermittent, les solutions sont changées au minimum trois fois par semaine pendant des jours non consécutifs (p. ex. lundi, mercredi et vendredi) ou plus fréquemment si nécessaire (c.-à-d. si la substance d'essai se dégrade, si les niveaux d'OD diminuent et/ou si les niveaux d'ammoniac augmentent), en fonction du plan d'expérience. Pour procéder au renouvellement de la solution, la quasi-totalité (c.-à-d. 80 %) de la solution d'essai est retirée de chaque récipient d'essai et remplacée par une solution fraîchement préparée. L'aspiration (c.-à-d. une aspiration avec l'ouverture recouverte d'un petit morceau de Nitex^{MC} ou d'un filet) constitue la procédure habituelle. Les déchets, les aliments non consommés et les autres débris devraient être siphonnés depuis le fond de chaque récipient et il faudrait veiller à ne pas toucher les têtards. Les têtards doivent rester immergés dans la solution d'essai en tout temps pendant le processus de renouvellement. La nouvelle solution d'essai doit être ajoutée au volume total initial de la solution d'essai dans chaque récipient. L'ensemble du processus doit se dérouler le plus prudemment possible et avec le moins d'agitation possible afin d'éviter de blesser les têtards. La solution qui est siphonnée ou autrement retirée doit faire l'objet d'un examen pour s'assurer qu'aucun

têtard n'a été accidentellement retiré. Ces organismes d'essai sont susceptibles d'être blessés et doivent être éliminés et notés sur la fiche de travail comme ayant été accidentellement retirés à ce moment-là; les résultats de l'essai doivent être analysés comme si les organismes d'essai éliminés n'avaient pas été présents.

Les essais avec renouvellement continu exigent un système qui distribue aux récipients d'essai une série de concentrations prémélangées de la substance ou de la matière d'essai, à un débit contrôlé. Divers dispositifs pourraient produire une série de plus en plus diluée de solutions filles de la solution mère ou d'une substance d'essai au moyen de pompes doseuses et de dilueurs proportionnels. On recommande, au minimum, un débit permettant un renouvellement complet du volume de solution au moins trois fois par semaine. Bien qu'en fonction de la substance d'essai et des objectifs de l'étude, un remplacement plus fréquent du volume de solution puisse être justifié. On devrait vérifier journalièrement, durant l'essai, le débit des solutions d'essai ou des solutions mères ainsi que celui de l'eau témoin ou de dilution. De plus, sa valeur ne devrait pas varier de plus de 10 %. Pour les expositions avec renouvellement continu, le volume souhaité de solution d'essai devrait être remplacé quotidiennement par des solutions d'essai fraîches (nouvelles) avec une agitation et/ou une perturbation minimale des têtards. Le lecteur est invité à consulter les documents suivants : APHA *et al.*, 2011; ASTM, 2023a, 2023b, pour obtenir de plus amples renseignements sur la conception de systèmes à renouvellement continu, les taux et les modes opératoires.

4.3.3 Température d'essai et éclairage

L'essai doit être réalisé à la température journalière moyenne de 23 ± 2 °C et la température devrait être de 23 ± 1 °C⁵⁸. En outre, la température instantanée

⁵⁸ Le taux de croissance et de différenciation des larves d'anoures est fortement influencé par la température. Les taux de différenciation et de croissance augmentent parallèlement à l'augmentation de la température chez *L. pipiens* jusqu'à atteindre un plateau à 23 °C (Smit-Gill et Berven, 1979 cités dans Ultsch *et al.*, 1999). Des différences aussi minimes que 1 °C entre les répétitions ont provoqué des différences dans le taux de développement chez *Xenopus laevis*, ce qui a entraîné l'élimination de ces répétitions en tant que valeurs aberrantes (Lutz *et al.*, 2008). De même, une différence

doit toujours être de 23 ± 3 °C. Il faut ajuster au besoin la température de l'échantillon ou de la solution à la valeur acceptable pour chaque solution. Il ne faut pas chauffer les échantillons ou les solutions d'essai par des thermoplongeurs, puisque ces derniers pourraient altérer les constituants chimiques et la toxicité. Il faut mesurer et consigner la température quotidiennement dans une répétition de chaque variante expérimentale, y compris les témoins. Les jours de renouvellement de la solution d'essai, les mesures doivent être effectuées à la fois dans la solution d'essai fraîche et dans la solution usagée juste avant ou juste après le changement.

L'éclairage des récipients d'essai doit avoir une *photopériode* fixe de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité et il devrait être assuré par des lampes à incandescence, fluorescentes ou DEL à spectre continu. L'intensité lumineuse à la surface de la solution dans chaque récipient d'essai devrait être de 100 à 500 lux et doit être d'au moins 100 lux. On recommande une transition progressive entre la lumière et l'obscurité (v. § 2.3.3).

4.3.4 Oxygène dissous et aération

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

Il pourrait être obligatoire ou convenable d'aérer au préalable (avant l'exposition des organismes d'essai) chaque solution d'essai, selon la nature de la substance d'essai, le type de l'essai et ses objectifs (v. § 4.1, 5.2 et 6.2). L'appareillage servant à exposer les têtards aux solutions d'essai, aérées ou non, est décrit dans le § 3.1.

Ce n'est que si le taux d'OD mesuré est inférieur à 60 % ou supérieur à 100 % de saturation en air dans une solution ou plusieurs solutions d'essai lorsqu'elles ont été fraîchement préparées pour le début de l'essai ou le renouvellement de la solution, que l'on devrait aérer au préalable chaque solution

de température de 1 °C entre deux laboratoires procédant à la même exposition avec *X. laevis* constitue le meilleur indicateur expliquant les différences notables dans le taux de développement entre ces deux laboratoires (Lutz *et al.*, 2008).

d'essai, y compris les témoins, avant d'y exposer les têtards. Pour y arriver, les solutions d'essai devraient être préalablement aérées⁵⁹ pendant 30 minutes à un débit de $6,5 \pm 1$ mL/min-L. Immédiatement après, on doit mesurer la teneur en OD de l'échantillon ou des solutions. Ce n'est que si le taux mesuré dans au moins une solution est inférieur à 60 % ou supérieur à 100 % de saturation en air que l'on devrait poursuivre, au même débit, pendant pas plus de 90 min, l'aération préalable de l'échantillon ou de toutes les solutions d'essai (y compris du témoin). Cette période supplémentaire doit être soit d'une durée de 90 minutes maximum ou le temps nécessaire (en dessous de 90 minutes) pour atteindre un taux de saturation de 60 % dans le milieu contenant la concentration maximale de substance d'essai (ou un taux de saturation de 100 %, en cas de sursaturation)⁶⁰. Immédiatement après l'aération, il faut exposer les têtards à chaque solution d'essai, qu'un taux de saturation de 60 à 100 % ait été atteint ou non dans l'échantillon ou dans toutes les solutions d'essai. Il faut également signaler dans les rapports toute aération préalable, y compris sa durée et son débit (v. § 7.1.6).

En cas de renouvellement intermittent (v. § 4.3.2), on doit aérer chaque solution d'essai, y compris les témoins, continuellement tout au long de l'essai, par une aération douce et contrôlée (p. ex. $6,5 \pm 1$ mL/min-L). L'aération doit être assurée à l'aide de méthodes classiques, notamment des vannes de régulation de l'air et un appareillage convenant à l'aération (p. ex. de l'air comprimé exempt d'huile fourni au moyen d'une pipette fine,

⁵⁹ On devrait préparer dans un récipient non toxique d'une contenance convenable un volume d'échantillon ou de chaque solution d'essai, qui permettrait de préparer ou de renouveler le milieu de toutes les répétitions. Pour l'aération préalable, on devrait utiliser de l'air comprimé exempt d'huile, fourni au moyen d'une pipette fine, d'un tube capillaire ou d'un diffuseur du commerce.

⁶⁰ L'aération peut entraîner les produits chimiques volatils qui se trouvent dans une solution ou elle pourrait accélérer l'oxydation et la dégradation en d'autres substances. Cependant, l'aération pourrait être nécessaire avant l'exposition des organismes d'essai en raison de la demande d'oxygène qu'exerce la substance d'essai (p. ex. épuisement de l'oxygène dans l'échantillon au cours de l'entreposage). S'il faut aérer préalablement la solution d'essai, il faut traiter *toutes* les solutions de la manière indiquée au § 4.3.4.

d'un tube capillaire ou d'une pierre poreuse; v. § 2.3.5).

L'oxygène dissous doit être mesuré et enregistré au début et à la fin de l'essai et avant chaque période de renouvellement de la solution d'essai (c.-à-d. au moins trois fois par semaine sur des jours non consécutifs) dans des concentrations d'essai représentatives (c'est-à-dire, au minimum, des concentrations d'essai minimales, médianes et maximales, et des témoins) des solutions d'essai fraîchement préparées, qui devraient satisfaire aux exigences de saturation ≥ 60 à ≤ 100 % décrites plus haut dans la présente section. On doit également effectuer des mesures dans les solutions d'essai usagées pour chaque concentration représentative afin d'établir l'ampleur de l'appauvrissement en oxygène qui s'est produit avant le renouvellement. Les mesures doivent être effectuées de manière à minimiser le risque de blesser accidentellement les têtards (p. ex. avant d'ajouter les têtards aux solutions d'essai au début de l'essai, sur des portions de solutions nouvelles ou usagées au cours de chaque période de renouvellement, ou après le retrait des têtards des solutions d'essai à la fin de l'essai).

La teneur en oxygène dans les récipients d'essai ne devrait pas descendre sous 60 % de saturation (5 mg/L à 23 °C). Si cela se produit, il faudrait être sensibilisé au fait que l'essai ne mesure pas la toxicité intrinsèque de la matière ou de la substance d'essai, mais l'effet total de la matière (p. ex. l'effluent) ou de la substance (produit chimique), y compris son influence désoxygénante. L'aération à faible niveau utilisée dans la présente méthode d'essai devrait maintenir des niveaux d'OD de ≥ 60 % de saturation^{61,62}.

⁶¹ Tout au long des essais interlaboratoires, le niveau d'oxygène dissous était généralement de ≥ 80 % de saturation; cependant, certains laboratoires ont parfois observé des niveaux de 68-79 % de saturation (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b). En outre, au cours de la première série d'essais, un laboratoire a signalé une diminution de l'OD à 50 %. Toutefois, après le renouvellement de l'eau, l'OD est remontée à 96 %; ce cas unique de faible OD n'a pas eu d'incidence sur la survie (Nautilus Environmental, 2020a). Il est à noter que les têtards de grenouille léopard sont connus pour tolérer des eaux à faible teneur en oxygène dissous, puisque l'ASTM (2022a) recommande une teneur minimale en oxygène dissous de 3,0 mg/L à 23 °C (environ 35 % de saturation). L'ASTM (2022a) indique qu'une valeur

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

4.3.5 pH

On doit mesurer le pH des concentrations d'essai représentatives (c.-à-d. des concentrations d'essai minimales, médianes et maximales, ainsi que des témoins) au début et à la fin de l'essai, ainsi qu'au début et à la fin de chaque période de renouvellement (c.-à-d. dans la solution d'essai fraîche et dans la solution usagée). Les mesures doivent être effectuées de manière à minimiser le risque de blesser accidentellement les têtards (p. ex. avant d'ajouter les têtards aux solutions d'essai au début de l'essai, sur des portions de solutions nouvelles ou usagées au cours de chaque période de renouvellement, ou après le retrait des têtards des solutions d'essai à la fin de l'essai).

On devrait normalement réaliser les essais de toxicité sans régler le pH. Cependant, si l'échantillon de la matière ou de la substance d'essai déplace le pH d'une solution à l'extérieur de l'intervalle 6,0 à 8,5 et que l'on souhaite évaluer les produits

d'OD < 3,0 mg/L peut stresser les organismes et induire une mortalité pendant le maintien des têtards de *L. pipiens* et les essais menés avec ces derniers.

⁶² Les eaux naturelles, les eaux du site ou la forte concentration occasionnelle d'une substance chimique peuvent avoir une forte demande en oxygène et épuiser l'oxygène dissous dans l'eau d'essai, ce qui peut réduire l'oxygène dissous dans les variantes expérimentales, même en cas d'aération.

chimiques toxiques plutôt que les effets nocifs ou perturbateurs du pH, il faudrait ajuster le pH des solutions ou de l'échantillon avant d'ajouter les têtards, ou mener parallèlement un second essai, avec le pH ajusté, en utilisant une partie de l'échantillon⁶³.

Pour un essai ajusté, le pH initial de l'échantillon ou de chaque solution d'essai pourrait, selon les objectifs, être ajusté, à 0,5 unité près, au pH de l'eau témoin ou de dilution avant d'y exposer les larves. Il serait également acceptable pour ce second essai, dont le pH est ajusté, de régler le pH pour chaque solution d'essai, y compris celui du témoin, à une valeur supérieure à 6,0 (si la solution a un pH <6,0) ou encore de l'abaisser à 8,5 (si la solution a un pH >8,5). Pour ces réglages, on devrait normalement utiliser de l'acide chlorhydrique (HCl) ou de l'hydroxyde de sodium (NaOH) titrant au plus 1 N. Dans certains cas (p. ex. échantillons d'effluents

⁶³ L'absence d'ajustement du pH de l'échantillon ou de la solution se justifie par le fait que le pH peut avoir une forte influence sur la toxicité de la substance ou de la matière d'essai. Ainsi, pour les concentrations (généralement) faibles de déchets trouvées dans l'eau réceptrice après dilution, toute modification du pH naturel, avec une modification concomitante de la toxicité, devrait être acceptée comme faisant partie de la pollution globale. En conséquence, le pH ne devrait pas être ajusté lors des essais, et c'est l'exigence à suivre dans la plupart des cas si les solutions d'essai se situent dans la plage de pH de 6,0 à 8,5. Des effets sur la capacité de survie, la croissance et le développement de *L. pipiens* ont été constatés lors d'expositions de 96 heures à un pH <4,4 (Freda et McDonald, 1990); aucun effet n'a été constaté à un pH de 8,7 lors d'une exposition de cinq jours (Jofre et Karasov, 1999). Bien que Schlichter (1981) ait constaté une diminution de la motilité des spermatozoïdes à un pH <6,5 et un impact négatif sur le développement des œufs à un pH <6,3, il a déterminé que les œufs fécondés à un pH presque neutre et transférés ensuite à un pH faible avaient un meilleur taux de survie. Cela justifie les différents niveaux de pH recommandés pour l'élevage des organismes d'essai par rapport à ceux recommandés pour les essais dans le présent document. Les plages de pH recommandées pour les essais tiennent compte des expositions à long terme (c.-à-d. de 14 à 42 jours), incluses dans le protocole de la présente méthode d'essai, du stade de développement auquel commence l'essai, ainsi que de l'expérience acquise au cours de l'étude interlaboratoire. Au cours des trois séries de l'étude interlaboratoire, quatre laboratoires participants ont mené avec succès des essais sur des têtards dans des eaux dont le pH était compris entre 6,1 et 8,4.

fortement tamponnés), on pourrait devoir utiliser un acide ou une base ayant une force supérieure. Abernethy et Westlake (1989) fournissent des indications utiles pour le réglage du pH.

4.3.6 Alimentation des grenouilles

Les têtards commencent à se nourrir lorsqu'ils nagent activement, quelques jours après l'éclosion, au stade 25 de Gosner. Pour les deux essais (14 jours et 42 jours), les têtards doivent être nourris à volonté, au moins quatre fois par semaine.

Trois des périodes de distribution de nourriture se déroulent sur des jours non consécutifs (p. ex. lundi, mercredi et vendredi) immédiatement après le renouvellement de la solution d'essai. Pour nourrir les têtards, on recommande une combinaison 4:1 de chou fourrager cuit à la vapeur ou décongelé et de nourriture séchée du commerce pour têtards (p. ex. Ward's), qui peut être préparée et distribuée sous forme de bouillie homogène (c.-à-d. qu'il faut s'assurer que le chou fourrager est suffisamment mélangé en petits morceaux; v. § 2.3.6). La quantité d'eau utilisée pour préparer la bouillie devrait être réduite autant que possible, afin d'éviter la dilution de la solution d'exposition. La bouillie devrait être préparée fraîchement chaque jour où a lieu la distribution de nourriture. La distribution d'un volume de bouillie d'environ 10 mL par réservoir convient bien pendant l'essai. La nourriture devrait être maintenue en suspension pendant toute la durée de l'alimentation (p. ex. en la faisant tourner de temps en temps) afin que la quantité de nourriture distribuée soit égale dans tous les réservoirs. La nourriture doit être distribuée à volonté; toutefois, des exemples de la quantité initiale de nourriture à fournir pendant l'essai sont basés sur un objectif de 10 % du poids corporel total des têtards dans une répétition donnée. Le poids de la nourriture fournie augmente donc au cours de l'essai pour répondre aux besoins accrus des organismes d'essai qui se développent. Des mesures provisoires non destructives du poids humide des têtards peuvent être effectuées en suivant les indications fournies au § 4.4. Des exemples de rations alimentaires sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 Exemple de rations alimentaires pour les essais de toxicité*

Semaine	Chou fourrager (g)	Nourriture séchée pour têtards (g)
Essai de 14 jours		
1	0,2	0,05
2	0,3	0,075
Essai de 42 jours		
1	0,3	0,075
2	0,4	0,1
3	0,5	0,125
4	0,6	0,15
5	0,7	0,175
Jusqu'à la fin de l'essai	0,8	0,2

* Les fréquences d'alimentation représentent des exemples de rations alimentaires pouvant être fournies comme point de départ pour chaque récipient d'essai contenant dix têtards, en commençant au SG 25 pour l'essai de 14 jours et au SG 28/29 pour l'essai de 42 jours.

Les rations alimentaires figurant au tableau 5 ne sont des exemples que pour les têtards commençant au SG 25 pour l'essai de 14 jours et les têtards commençant au SG 28/29 pour l'essai de 42 jours. Les rations doivent être ajustées en fonction des observations quotidiennes de la nourriture restante (v. § 2.3.6). Bien que les organismes d'essai soient nourris tous les deux jours, ils doivent avoir accès à la nourriture en tout temps. Si, au cours des observations quotidiennes, on constate que la totalité de la nourriture a disparu dans plus de la moitié des récipients d'essai, la ration alimentaire doit être augmentée. De même, les rations alimentaires doivent être réduites s'il reste de la nourriture dans le témoin de l'eau de dilution au moment du renouvellement de la solution d'essai (c.-à-d. deux jours après avoir été placées dans le récipient d'essai)⁶⁴. La quantité de nourriture ajoutée à chaque récipient d'essai doit être la même lors d'une distribution de nourriture donnée.

⁶⁴ Une alimentation réduite peut être due à une exposition à des substances toxiques ou à l'arrêt de l'alimentation pendant la métamorphose. Les rations alimentaires peuvent également être réduites pour compenser les décès ou si des spécimens métamorphes sont retirés d'une répétition (c.-à-d. s'il y a moins d'organismes d'essai dans le récipient). Par conséquent, la diminution des rations alimentaires est basée sur les observations du témoin de l'eau de dilution.

Le régime à base de chou fourrager et de nourriture séchée pour têtards doit être complété un jour par semaine (c.-à-d. par une quatrième distribution de nourriture par semaine, généralement la fin de semaine pour des raisons de commodité) par des agglomérés ou des gaufrettes d'algues (p. ex. des mini gaufrettes aux algues Hikari), distribués à volonté (v. § 2.3.6). Le poids des agglomérés ou gaufrettes d'algues est basé sur un objectif de 3 % du poids corporel total des têtards dans une répétition donnée. Pour l'essai de 14 jours, il s'agit généralement d'un à deux agglomérés d'algues par réservoir. Pour l'essai de 42 jours, la première distribution de nourriture est généralement de deux agglomérés d'algues par réservoir, puis on augmente progressivement la quantité au cours de l'essai d'un à deux agglomérés d'algues par semaine. Les agglomérés d'algues peuvent être brisés ou partiellement broyés avant d'être donnés. Les rations alimentaires doivent être ajustées sur la base des observations quotidiennes de la nourriture restante, comme le décrit le paragraphe précédent.

On doit consigner en détail le type de nourriture et les rations ajoutés à chaque récipient d'essai à chaque distribution de nourriture. Les observations du comportement alimentaire et des aliments non consommés dans chaque récipient d'essai devraient également être consignées lors des observations quotidiennes.

4.4 Observations et mesures pendant l'essai

Il faut observer et consigner l'état, l'aspect et le nombre de têtards vivants introduits dans chaque récipient d'essai au jour 0.

Les récipients d'essai doivent être examinés quotidiennement pendant toute la durée de l'essai. On devrait alors faire des observations et consigner l'alimentation, l'apparence inhabituelle de la solution d'essai, ainsi que la présence et la quantité de nourriture non consommée. Il faut consigner toute mortalité, apparence inhabituelle (c.-à-d. malformations ou lésions grossièrement visibles) ou tout comportement des organismes d'essai ainsi que le stade de développement approximatif. Le nombre de têtards morts doit être enregistré et ces individus doivent être enlevés dès leur observation.

Pour l'essai de 42 jours, tout organisme d'essai atteignant le stade 42 de Gosner (c.-à-d. caractérisé par l'émergence des deux membres antérieurs) doit être retiré du récipient d'essai, euthanasié, et les mesures de fin d'essai (c.-à-d. le poids humide, la longueur, la biomasse, le stade de développement et les difformités éventuelles) doivent être effectuées et consignées (v. § 4.5).

La mortalité est déterminée lorsqu'un organisme ne semble pas avoir de fonctions respiratoires, qu'il ne bouge pas/ne réagit pas à des stimuli légers à l'aide d'une baguette de verre ou lorsqu'il est retiré de l'eau.

Les têtards aux premiers stades (SG 25-30) ne sont généralement actifs que par intermittence et se reposent normalement au fond du réservoir. De même, les têtards aux stades plus avancés (SG 30-42) ne sont actifs que par intermittence, bien qu'ils montrent une réaction de sursaut plus forte (p. ex. lors du siphonnage pendant le changement d'eau) que les têtards plus jeunes. Lorsqu'on ajoute de la nourriture au réservoir, les têtards aux premiers stades et aux stades plus avancés ne réagissent pas en se nourrissant immédiatement. Sauf pour se nourrir d'organismes morts ou mourants, les têtards ne manifestent pas d'agressivité à l'égard de leurs congénères. Étant donné leur niveau d'activité généralement plus faible que celui de certaines espèces de poissons (p. ex. la truite arc-en-ciel), la toxicité qui se manifeste par un comportement anormal n'est probablement pas apparente. Un comportement anormal pourrait toutefois se manifester par une nage non coordonnée, une hyperventilation et une perte d'équilibre. Les malformations générales pourraient inclure des déformations des membres, une scoliose, des lésions, un œdème, une nécrose de la queue et/ou des infections bactériennes ou fongiques visibles⁶⁵.

⁶⁵ Plusieurs malformations sont courantes chez les têtards de *L. pipiens*. Elles ne semblent pas liées à l'exposition à un toxique et ne sont pas nécessairement préjudiciables à l'organisme. Il s'agit notamment de la scoliose, d'une patte qui ne se plie pas et de certaines malformations des orteils, de la bouche et des yeux. La scoliose a été observée lors de la troisième série de l'étude interlaboratoire d'Environnement et Changement climatique Canada, qui affichait des pourcentages de têtards présentant une scoliose allant de 3,6 % à 22,6 %. L'incidence de la scoliose n'était pas liée à la dose de perchlorate, et aucune tendance évidente (p. ex. entre les

Il faut mesurer la température dans les solutions d'essai (§ 4.3.3) quotidiennement (p. ex. au moyen d'un thermomètre à maximum et à minimum) ou en continu (p. ex. au moyen d'un appareil d'enregistrement). L'oxygène dissous et le pH doivent être mesurés selon les indications des § 4.3.4 et 4.3.5. On devrait également mesurer la conductivité dans des solutions d'essai fraîches, au moins au début de l'essai et au début de chaque période de renouvellement de l'eau. Les niveaux d'ammoniac total doivent être mesurés, au minimum, dans des répétitions représentatives des concentrations minimales, médianes et maximales, ainsi que dans les témoins, au début et à la fin de l'essai, et au début et à la fin d'un renouvellement de l'eau chaque semaine. Toutefois, si les niveaux d'ammoniac avant le renouvellement de la solution sont acceptables, les mesures de l'ammoniac dans la solution d'essai fraîche peuvent être omises. Il faudrait renouveler plus fréquemment les solutions d'essai si les niveaux de pH dérivent jusqu'à <6,0 ou >8,5 et si les concentrations d'ammoniac augmentent jusqu'à >0,2 mg/L de NH₃-N non ionisé (v. § 2.3.5 et 4.3.5). En outre, la dureté et/ou l'alcalinité de l'eau témoin/de dilution et, au minimum, la concentration d'essai maximale devraient être mesurées et communiquées au début de l'essai et une fois par semaine.

L'oxygène dissous, la conductivité et le pH peuvent être mesurés à l'aide de sondes et de compteurs étalonnés. L'ammoniac peut être mesuré à l'aide d'une électrode sélective d'ions ou en extrayant une aliquote de la solution d'essai pour cette analyse. Toute sonde insérée dans un récipient d'essai doit être rincée dans de l'eau désionisée ou distillée entre les échantillons afin de minimiser la contamination croisée. Pour les mesures de la dureté, de l'alcalinité et de l'ammoniac nécessitant des aliquotes, il faudrait prélever les échantillons de la solution d'essai directement dans le récipient d'essai ou dans la solution usagée.

Outre les observations décrites ci-dessus, certaines observations et mesures supplémentaires doivent

répétitions) n'a été observée (Nautilus Environmental, 2020b). On ne connaît pas les conséquences de la scoliose sur la santé de ces organismes d'essai d'un point de vue écologique. Toutefois, dans le cadre de mesures en laboratoire, la scoliose des têtards pourrait influencer sur la précision des mesures de la longueur totale.

être effectuées lors des essais avec des substances chimiques (v. § 5.4). Si des produits chimiques doivent être mesurés, on devrait prélever des aliquotes dans les concentrations d'essai à teneur inférieure, moyenne et supérieure et dans les solutions témoins, au début et à la fin de l'essai au minimum (v. § 5.4).

Des mesures provisoires non destructives du développement des têtards (stade de Gosner), des déformations générales, du développement asynchrone, du poids humide et de la longueur totale (et éventuellement de la longueur du museau-cloaque) devraient être effectuées tous les 14 jours au cours de l'essai de 42 jours⁶⁶. Pour mesurer le poids humide, il faut récupérer un têtard à l'aide d'un filet, le tapoter contre une serviette en papier pour éliminer l'eau autant que possible et le faire basculer du filet dans un plat taré. Une petite quantité d'eau peut ensuite être ajoutée au plat pour maintenir le têtard humide pendant qu'on effectue le reste des mesures. La détermination du stade devrait se faire conformément aux lignes directrices fournies au § 4.2, en veillant à ce que les têtards soient manipulés avec le plus grand soin, qu'ils soient recouverts d'eau en tout temps (sauf pendant la mesure du poids) et que les mesures soient effectuées aussi rapidement que possible afin d'éviter toute surchauffe ou tout stress inutile. Les mesures de la longueur de chaque têtard vivant peuvent être effectuées en même temps à l'aide d'une règle, d'un pied à coulisse ou de l'imagerie numérique. Il est recommandé d'acquérir de

⁶⁶ Les mesures provisoires de la troisième série de l'étude interlaboratoire d'Environnement et Changement climatique Canada avec le perchlorate ont montré des paramètres de croissance plus sensibles après 14 et 28 jours d'exposition par rapport à la fin de l'essai (42 jours). En outre, aucun cas de mortalité n'a été observé directement après ces mesures provisoires non destructives, ce qui indique que le stress lié à la manipulation des têtards individuels était minime. Les mesures provisoires pourraient être moins précises que les mesures finales prises sur des individus euthanasiés, car il peut être difficile de travailler rapidement avec des organismes vivants. L'uniformité des méthodes utilisées pour manipuler les têtards et prendre les mesures pourrait améliorer la précision. En outre, pour l'évaluation du stade de développement en particulier, la précision pourrait être améliorée si le même observateur effectue toutes les évaluations provisoires et finales (Nautilus Environmental, 2020b).

l'expérience dans la manipulation, la détermination du stade et la prise de mesures sur des têtards vivants avant d'effectuer ces mesures provisoires non destructives dans le cadre d'un essai définitif.

4.5 Fin de l'essai

À la fin des deux essais (14 ou 42 jours, selon l'option choisie), on doit consigner le nombre et le pourcentage de têtards et/ou de spécimens métamorphes survivants dans chaque répétition. Les têtards ou spécimens métamorphes vivants sont retirés du récipient d'essai et euthanasiés sans cruauté (p. ex. par immersion dans une solution de méthanesulfonate de tricaine [MS-222], tamponnée à un pH d'environ 7 à l'aide de bicarbonate de sodium⁶⁷. Une fois la mortalité confirmée (v. la

⁶⁷ Selon les lignes directrices du CCPA sur l'euthanasie des amphibiens (CCPA, 2010, 2021), les méthodes acceptables comprennent l'immersion dans une solution de MS-222 ou de benzocaïne tamponnée, ou l'injection de cette solution, l'application topique de gel de benzocaïne, l'injection de barbituriques dans le sac lymphatique ou une surdose d'anesthésiques inhalés. Les larves d'amphibiens devraient être euthanasiées selon les mêmes méthodes que les adultes (AVMA, 2020; CCPA, 2021). On recommande l'immersion dans une solution de MS-222 tamponnée suivie d'une méthode physique d'euthanasie; la congélation dans l'azote liquide est acceptable, mais les larves de grande taille devraient être anesthésiées avant d'utiliser cette méthode (AVMA, 2020; CCPA, 2021).

La méthode par inhalation doit être suivie d'une méthode physique d'euthanasie (c.-à-d. la décapitation ou le retrait de la moelle), mais les inhalations ne sont généralement pas efficaces pour les amphibiens et ne sont pas acceptables pour l'espèce *Xenopus* (CCPA, 2021). Pour la méthode d'immersion, le CCPA (2021) renvoie aux lignes directrices de l'AVMA (2020), qui recommandent une immersion prolongée dans une solution de MS-222 tamponnée à une concentration de 5 à 10 g/L pendant au moins une heure. Les méthodes d'immersion et d'application topique devraient être suivies d'une méthode physique secondaire pour s'assurer que les organismes sont morts (CCPA, 2021). La dose d'immersion recommandée pour les têtards de *L. pipiens* dans la méthode d'essai de toxicité des sédiments de l'ASTM (2022a) est de 1 mL d'une solution de MS-222 à 2 g/L, tamponnée à un pH de 7, dans 10 à 20 mL d'eau contenant les organismes d'essai. Robinson *et al.* (2019a, 2020, 2021) ont anesthésié des têtards de *L. pipiens* par immersion dans une solution de MS-222 tamponnée à 0,01-0,02 %, puis ont euthanasié les têtards par

détermination de la mortalité au § 4.4), les animaux sont retirés de la solution de MS-222, rincés et placés sur une serviette en papier pour éliminer l'excès d'humidité. Le stade de développement (stade de Gosner) de chaque têtard ou spécimen métamorphe doit être déterminé à l'aide d'un stéréomicroscope de dissection et enregistré. Les figures 2.1 et 2.2 fournissent des indications sur l'attribution du stade de Gosner approprié⁶⁸. Toute détermination de développement asynchrone doit également être signalée⁶⁹. En cas d'observation d'un

immersion dans une solution de MS-222 tamponnée à 0,2 %. Robinson *et al.* (2019b) ont euthanasié des grenouilles *L. pipiens* au SG 46 par immersion directe dans une solution de MS-222 tamponnée à 1 %. Allran et Karasov (2000) ont anesthésié des spécimens métamorphes de *L. pipiens* dans 0,5 g/L de MS-222 suivi d'une euthanasie par décérébration. L'OCDE (2009) et l'EPA des États-Unis (2015) recommandent respectivement 150 à 200 mg/L et 0,03 % (p/v) de MS-222 tamponnée pour euthanasier *X. laevis*. Torreilles *et al.* (2009) ont cependant déterminé que des doses plus élevées que celles recommandées par l'OCDE (2009) étaient nécessaires pour l'euthanasie de *X. laevis*. L'immersion des grenouilles dans 5 g/L de MS-222 a entraîné une anesthésie profonde en 4 minutes, mais il a fallu au moins 1 heure d'immersion à cette concentration pour euthanasier de manière fiable 100 % des organismes d'essai *X. laevis*. L'huile de clou de girofle (eugénol) s'est révélée être une solution de rechange plus sûre et plus économique que le MS-222, et a été utilisée dans certaines études pour euthanasier les têtards d'amphibiens d'Amérique du Nord (McDaniel *et al.*, 2004) et les poissons (Holloway *et al.*, 2004). Cependant, l'huile de clou de girofle n'est pas approuvée au Canada pour une utilisation sur les amphibiens (CCPA, 2021).

⁶⁸ Au stade 25 de Gosner, le spiracle devrait être présent et les branchies externes sont atrophiées. Du SG 26 au SG 30, la principale caractéristique distinctive est la longueur du bourgeon du membre postérieur. Du SG 31 au SG 35, des changements dans la formation du pied et l'indentation se produisent. Du SG 36 au SG 39, on observe une séparation des orteils et l'apparition de tubercules métatarsiens et de plaques sous-articulaires. Au SG 40, des tubercules sur la surface du pied et un tube du cloaque sont présents. Au SG 41, les membres antérieurs sont visibles et sous la peau, et le tube du cloaque a disparu. Au SG 42, les deux membres antérieurs sont apparus (un membre antérieur peut apparaître avant l'autre) (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b).

⁶⁹ Les données relatives au stade de développement peuvent être utilisées pour déterminer si le développement est accéléré, retardé ou non perturbé. L'accélération ou le

développement asynchrone, la détermination du stade de développement du têtard devrait être basée sur la caractéristique la plus avancée⁷⁰. Chaque têtard est ensuite placé dans un plateau de pesée taré, pesé individuellement sur une balance électronique (à 0,01 g près) et le poids humide doit être consigné. La longueur totale du corps (et éventuellement la longueur du museau-cloaque, c.-à-d. la longueur entre l'extrémité du museau et l'anus)⁷¹ pour chaque têtard doit ensuite être mesurée le long de la ligne centrale du corps (à 0,5 mm près) à l'aide d'une règle métrique, d'un pied à coulisse ou de l'imagerie

retard du développement est déterminé en comparant le stade moyen atteint par le groupe témoin et le groupe traité. Un développement asynchrone peut être constaté lorsque les tissus sont examinés et qu'ils ne présentent pas de malformation ou de caractéristiques anormales, mais que la chronologie relative du développement des différents tissus est perturbée au sein d'un même têtard (OCDE, 2009). Dans le cadre de l'étude interlaboratoire d'Environnement et Changement climatique Canada, la longueur et le développement des membres postérieurs ont été utilisés de concert avec le stade de développement du corps du têtard pour déterminer si le développement était asynchrone. Un développement asynchrone a été constaté lorsque la chronologie relative de la morphogenèse ou du développement de différentes parties du corps a été perturbée. Un développement asynchrone a été observé chez les têtards exposés à 0,67 µg/L de thyroxine lors de la deuxième série de l'étude interlaboratoire d'Environnement et Changement climatique Canada. Lorsqu'un développement asynchrone est observé, un jugement professionnel est nécessaire pour attribuer définitivement le stade de Gosner à un têtard individuel (Fort Environmental Laboratories Inc., 2018).

⁷⁰ Par exemple, si les deux membres antérieurs d'un têtard sont apparus, mais que les membres postérieurs n'ont pas de tubercule métatarsien, le SG 42 lui sera attribué.

⁷¹ Au cours de l'enquête interlaboratoire d'Environnement et Changement climatique Canada, les mesures de la longueur du museau-cloaque et de la longueur totale ont montré une sensibilité équivalente aux toxiques testés dans les trois séries (NaCl, triclosan et perchlorate). Par conséquent, la longueur totale constitue la mesure privilégiée et requise pour la longueur, car elle est plus facile à identifier que l'emplacement du tube du cloaque requis pour la mesure de la longueur du museau-cloaque (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b). On peut mesurer la longueur du museau-cloaque en tant que paramètre supplémentaire facultatif; une mesure supplémentaire de la longueur peut être utile pour identifier les valeurs aberrantes ou les erreurs de transcription des mesures de la longueur totale.

numérique, puis consignée⁷². Quelle que soit la méthode utilisée pour mesurer la longueur et le poids des têtards, toutes les mesures doivent être effectuées selon la même méthode. Les vérifications de l'instrument et de la précision ainsi que l'entretien régulier font partie du système de gestion de la qualité du laboratoire (ISO, 2017).

Bien qu'Environnement et Changement climatique Canada ait souhaité utiliser la longueur totale corrigée, la longueur corrigée du museau-cloaque (LMC), le poids humide corrigé et la biomasse corrigée (v. § 4.6.1) comme critères de validité supplémentaires pour les essais définitifs, la quantité de données au moment de la publication sur lesquelles fonder des exigences minimales pour les organismes témoins était insuffisante. Les valeurs moyennes les plus basses obtenues pour les paramètres de croissance au cours des essais de développement de la méthode d'Environnement et Changement climatique Canada peuvent toutefois servir de points de référence pour la croissance réalisable des organismes témoins.

⁷² Une méthode de photographie numérique et un logiciel de numérisation peuvent être utilisés pour effectuer des mesures de longueur à la fin de l'essai et sont recommandés pour les méthodes d'essai de métamorphose des amphibiens (EMA) de l'OCDE (2009) et de l'EPA des États-Unis (2009). Cependant, la précision des mesures effectuées à l'aide de la photographie numérique dépend de la position du têtard ou du spécimen métamorphe par rapport à la plateforme du microscope de dissection et à l'objectif de l'appareil photo (Coady *et al.*, 2014). Coady *et al.* (2014) ont estimé que la mesure à 0,1 mm près était raisonnable en raison de la précision de la mesure due à la variabilité du positionnement du microscope pour l'imagerie. Il peut être difficile de mesurer la longueur du museau-cloaque en raison de la difficulté à observer clairement le cloaque sur les photographies numériques (Coady *et al.*, 2014). Dans l'enquête interlaboratoire d'Environnement et Changement climatique Canada, les mesures de la longueur totale du corps effectuées par un laboratoire à l'aide d'une règle ont été vérifiées par un consultant indépendant à l'aide de la numérisation informatique. En moyenne, les mesures numériques étaient inférieures de 2,4 mm à celles enregistrées à l'aide d'une règle. La numérisation par ordinateur permettant de mesurer la courbure du corps, ces résultats étaient surprenants. Les différences ont été attribuées à la plus grande résolution de l'extrémité du museau et de la queue lors de la numérisation par ordinateur par rapport à la mesure manuelle (Fort Environmental Laboratories, Inc., 2018).

Ces valeurs sont les suivantes pour l'essai de 14 jours :

- longueur totale moyenne corrigée $\geq 14,4$ mm
- LMC moyenne corrigée $\geq 4,2$ mm
- poids humide moyen corrigé $\geq 0,18$ g
- biomasse moyenne corrigée $\geq 0,16$ g

Ces valeurs sont les suivantes pour l'essai de 42 jours :

- longueur totale moyenne corrigée $\geq 13,2$ mm
- LMC moyenne corrigée $\geq 4,8$ mm
- poids humide moyen corrigé $\geq 0,44$ g
- biomasse moyenne corrigée $\geq 0,42$ g

Toute apparence inhabituelle ou anomalie morphologique doit également être consignée. Les malformations générales pourraient comprendre notamment des déformations des membres, une scoliose (v. note de bas de page 65 au § 4.4), des lésions, un œdème, une queue courbée, une nécrose de la queue, et/ou des infections bactériennes ou fongiques (Rostand, 1958; Bantle *et al.*, 1991; Ouellet, 2000).

À moins d'utiliser les organismes d'essai pour des analyses de l'histologie, des tissus ou de l'expression génétique, le poids sec des organismes d'essai peut être mesuré en tant que paramètre supplémentaire facultatif. En fonction des objectifs de l'étude, les organismes d'essai peuvent également être placés dans des flacons étiquetés au préalable (soit en tant que groupe par répétition ou variante expérimentale, soit individuellement) contenant une solution de fixation aux fins de détermination future⁷³ ou plus poussée des paramètres (v. § 4.6.3.2).

Des échantillons de tissus peuvent également être prélevés à la fin de l'essai, avant séchage et/ou conservation, aux fins d'analyse histologique ou

⁷³ On peut conserver les têtards après euthanasie dans du formol tamponné neutre à 10 % selon un rapport d'environ 1:10 entre le tissu et l'agent de conservation (Nautilus Environmental, 2020b). Par ailleurs, le fixateur de Davidson a été utilisé avec succès par un participant interlaboratoire pour préserver les têtards en vue de l'évaluation des paramètres de développement et des paramètres histologiques supplémentaires à une date ultérieure (Nautilus Environmental, 2020a).

d'analyse de l'expression des gènes. Des biopsies peuvent être prélevées sur des têtards vivants. Différentes techniques de conservation des tissus ou des organismes entiers sont nécessaires en fonction des objectifs de l'étude. Il est conseillé d'accorder une attention particulière à ces techniques et aux paramètres supplémentaires recherchés dans une étude donnée (v. § 4.6.3.2).

4.6 Paramètres d'essai et calculs

4.6.1 Paramètres biologiques

Les paramètres biologiques requis pour les deux options d'essai décrites ici comprennent les effets nocifs des matières ou substances d'essai sur la capacité de survie, la croissance (longueur totale, poids humide et biomasse)⁷⁴ et le développement (retardé ou accéléré) des têtards de *L. pipiens*. Il faut également évaluer et consigner les malformations générales et le développement asynchrone⁷⁵. La longueur du museau-cloaque constitue un paramètre supplémentaire facultatif pour les deux essais.

À la fin de l'exposition, le nombre de têtards vivants et morts est consigné pour chaque répartition du groupe témoin et des différentes concentrations de la matière ou de la substance d'essai.

Pour chaque essai, le pourcentage de survie moyen (\pm écart-type) pour toutes les répétitions ($n = 3, 4$ ou 8) comprenant des têtards exposés à chaque variante expérimentale pendant la durée de l'essai doit être calculé et rapporté.

⁷⁴ L'hypothèse habituelle dans un cadre de toxicité est une diminution de la croissance, et le travail d'élaboration de la méthode s'est concentré sur les observations et l'analyse de l'inhibition de la croissance. Cependant, les substances qui perturbent la fonction thyroïdienne peuvent provoquer une augmentation de la croissance (M. Gallant, Nautilus Environmental, Burnaby [Colombie-Britannique], communication personnelle, 2023). En lieu et place de directives normalisées, les chercheurs sont encouragés à interpréter et à analyser l'augmentation de la croissance au cas par cas.

⁷⁵ Les malformations générales et le développement asynchrone sont moins susceptibles d'être observés dans l'essai de 14 jours parce que la durée de l'essai est plus courte (c.-à-d. que les têtards ont moins de temps pour se développer) et que l'essai commence avec des organismes plus jeunes (c.-à-d. que les stades des têtards sont plus axés sur la croissance que sur des changements morphologiques notables).

Le paramètre de croissance pour ces essais est basé sur la longueur totale moyenne (de l'extrémité du museau à l'extrémité de la queue) et le poids humide moyen de chaque têtard ou spécimen métamorphe survivant dans chaque variante expérimentale à la fin de l'essai, ainsi que sur la biomasse pour chaque répétition. Avant d'effectuer tout calcul statistique, les mesures de poids et de longueur doivent être corrigées en utilisant les poids et longueurs initiaux (c.-à-d. que les moyennes des mesures de poids et de longueur effectuées sur les 20 organismes représentatifs des organismes d'essai utilisés au début de l'essai (v. § 4.2) sont soustraites des valeurs mesurées à la fin de l'essai pour obtenir les mesures corrigées de poids et de longueur)⁷⁶. On considère qu'une forte diminution de la taille ou du poids est révélatrice d'un effet toxique négatif de la variante expérimentale sur la croissance des têtards et spécimens métamorphes survivants⁷⁷. La biomasse doit être calculée comme le poids humide total corrigé par répétition divisé par le nombre de têtards placés dans la répétition au début de l'essai (probablement dix têtards). Le paramètre de la biomasse représente une combinaison de l'effet subléthal (c.-à-d. la réduction du poids humide total des organismes d'essai survivants dans chaque répétition à la fin de l'essai) et de la mortalité⁷⁸, une

⁷⁶ L'utilisation de valeurs corrigées permet d'isoler la croissance du têtard pendant l'exposition dans le cadre de l'essai. La correction du poids humide initial et de la longueur a amélioré la comparaison des résultats interlaboratoires (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b). Comme il est possible de corriger de légères variations dans les organismes utilisés pour démarrer l'essai, la réduction de la variabilité intralaboratoire devrait également être possible au fil du temps.

⁷⁷ Les observations indiquent la possibilité d'un retard de développement chez les têtards présentant une croissance réduite. Cette situation a été observée lors de la première série de l'étude interlaboratoire d'Environnement et Changement climatique Canada lors des essais avec du NaCl. Il faut être prudent dans l'interprétation des résultats dans ces cas, où l'impact sur le développement peut ne pas être dû à une perturbation de la thyroïde, mais simplement à un effet indirect découlant de l'impact sur la croissance (p. ex. comme avec du NaCl).

⁷⁸ À l'occasion, des effets doubles peuvent être observés : la croissance des organismes survivants augmente alors qu'une mortalité partielle est observée (Nautilus Environmental, 2020a). En raison de la mort de certains organismes, ceux qui restent pourraient disposer d'une

approche actuellement utilisée dans l'essai de croissance larvaire de la tête-de-boule au Canada (EC, 2011) et aux États-Unis (USEPA, 2002). Étant donné qu'il intègre les effets sur la survie et ceux sur la croissance, le paramètre de la biomasse peut se révéler plus sensible aux échantillons toxiques que le paramètre de la croissance basé uniquement sur l'effet subléthal. Le § 8.2 du Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité d'Environnement Canada (EC, 2005) décrit l'utilisation de ce paramètre comme l'une des trois options permettant de mesurer la croissance en tant qu'effet subléthal quantitatif. Pour faire ce calcul dans le cas de la survie ou de la biomasse, il faudrait déduire du nombre initial d'organismes d'essai de cette répétition au début de l'essai les organismes d'essai qui ont été accidentellement tués ou enlevés durant le renouvellement des solutions d'essai, comme s'ils ne faisaient pas partie de l'essai.

Le paramètre du développement pour ces essais est basé sur le stade de Gosner atteint par chaque têtard à la fin de l'essai⁷⁹. Le stade de Gosner moyen pour

plus grande quantité de solution d'essai, de plus d'espace et/ou de plus de nourriture, ce qui risque d'influer sur la croissance ou la santé des organismes survivants. Ces possibilités devraient être prises en compte lors de l'interprétation des résultats des essais (EC, 2005). Les données devraient être examinées graphiquement afin de déterminer la présence ou l'absence d'une relation entre la croissance et la survie. Bien qu'aucune correction statistique ne puisse être apportée à ces interactions dans les analyses de régression standard, les effets devraient être signalés s'ils sont apparents et des mesures potentielles (p. ex. une densité plus faible d'organismes d'essai) devraient être prises dans les essais futurs pour garantir que des modes opératoires sont en place pour minimiser le potentiel de ces effets (EC, 2005). Le calcul de la biomasse (au lieu de la croissance directe) peut parfois s'avérer efficace pour traiter cet effet double. L'intégration de l'effet double est également possible en incluant « Count_Survival » (Dénombrement_Survie) dans les modèles mixtes linéaires généraux à l'aide du logiciel R (Robinson *et al.*, 2017; S. Robinson, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa [Ontario], communication personnelle, 2023).

⁷⁹ Dans l'évaluation interlaboratoire d'Environnement et Changement climatique Canada, il a été déterminé que l'erreur de mesure concernant l'attribution du stade de développement est d'environ 1 stade de Gosner (Nautilus Environmental, 2020b). Cela résulte de la subjectivité liée à l'attribution du stade de développement sur la base

chaque répétition doit être calculé et indiqué. Le stade de Gosner moyen pour chaque variante expérimentale, y compris le ou les témoins, doit également être calculé, sur la base des moyennes des répétitions ($n = 3, 4$ ou 8), et signalé. En fonction des objectifs expérimentaux, les chercheurs peuvent choisir d'autres techniques sans distribution⁸⁰ pour les statistiques sommaires (p. ex. fourchette interquartile, maximum, minimum) pour les répétitions individuelles ou les répétitions groupées.

La présence de têtards anormaux (c.-à-d. de têtards présentant des déformations générales) doit être notée et signalée à la fin de l'essai. Toute incidence du développement asynchrone (v. § 4.5) doit également être signalée en cas d'observation.

Tout têtard qui atteint le SG 42 (c.-à-d. l'émergence des deux membres antérieurs) avant la fin de l'essai doit être retiré du récipient d'essai, et la date de son retrait doit être consignée et signalée. Ces organismes (spécimens métamorphes) doivent être euthanasiés et les mesures finales, effectuées selon les indications ci-dessus⁸¹. Pour les besoins des analyses statistiques, ils sont traités comme s'ils avaient survécu jusqu'à la fin de l'essai, même s'ils ont été retirés avant la fin de ce dernier.

d'observations semi-quantitatives au cours de certains stades (p. ex. le rapport entre la longueur et la largeur du bourgeon de membre aux SG 26-30) ou, dans certains cas, de la différence dans les taux de développement d'un côté de l'organisme par rapport à l'autre (p. ex. l'indentation de l'orteil peut ne pas être la même des deux côtés d'un têtard donné).

⁸⁰ Le stade de Gosner est une mesure qui n'est pas normalement distribuée. Ainsi, les statistiques sommaires qui reposent sur la distribution normale (p. ex. la moyenne, l'écart-type) ne sont pas appropriées.

⁸¹ Les spécimens métamorphes sont retirés du récipient d'essai pour éviter qu'ils ne se noient, car ils ont besoin d'une surface terrestre que le récipient d'essai pour têtards n'a pas. En outre, cette méthode d'essai biologique est conçue pour mesurer les effets sur les têtards jusqu'à la métamorphose, mais pas au-delà. Les spécimens métamorphes sont euthanasiés afin de réaliser des mesures finales plus précises des paramètres biologiques. Le § 4.6.3 fournit des orientations supplémentaires sur d'autres plans d'expérience, notamment l'allongement de la durée de l'essai, si les objectifs de l'étude comprennent l'évaluation des effets sur les spécimens métamorphes.

Le plan d'expérience le plus courant pour les méthodes décrites dans le présent document implique des concentrations multiples d'un toxique, obtenues en testant un échantillon de substance ou produit chimique (§ 5.2) à une gamme de concentrations afin de calculer des estimations ponctuelles pour la survie et la croissance, ainsi que les effets nocifs sur le développement. Des échantillons d'effluents, d'élutriats ou de lixiviats (v. § 6.2) peuvent également être évalués dans le cadre d'expositions à des concentrations multiples à l'aide de cette méthode. Pour un essai à concentrations multiples, il faut calculer et signaler (si les données le permettent) la *CL50* ou autre *CLp*⁸² pour la survie, les *CLp* pour la croissance (longueur totale, poids humide et biomasse) et les effets significatifs sur le développement (stade de Gosner).

Les essais à concentration unique (échantillons mis à l'essai à la concentration maximale seulement) peuvent être réalisés à l'aide des méthodologies décrites dans le présent document et sont abordés ailleurs (v. § 6.5.1).

4.6.2 Essais à concentrations multiples

Dans un essai à concentrations multiples, les paramètres statistiques sont les suivants : (i) une *CLp* et ses limites de confiance à 95 % pour la mortalité des têtards, et (ii) des *CLp* et leurs limites de confiance à 95 % pour la croissance (c.-à-d. la longueur totale, le poids humide et la biomasse, tous corrigés en fonction des mesures initiales) des organismes d'essai survivants à la fin de l'essai⁸³, et

⁸² Pour un essai de létalité typique, les chercheurs choisissent des concentrations d'exposition qui devraient entraîner une mortalité partielle et complète, dans le but de garantir un calcul rigoureux de la *CL50*. En revanche, cette méthode d'essai est axée sur les effets chroniques et sublétaux. Les chercheurs sont donc encouragés à choisir des concentrations de substances toxiques qui devraient entraîner une mortalité inférieure à 50 %. En conséquence, la *CL25* peut constituer un paramètre plus approprié. Par ailleurs, si l'objectif est de se concentrer uniquement sur les effets sublétaux, l'analyse de la létalité serait facultative.

⁸³ Par le passé, les chercheurs ont fréquemment analysé les données *quantitatives* sur les effets sublétaux à partir des résultats d'essais à concentrations multiples, en calculant la concentration sans effet observé (CSEO) et la concentration minimale avec effet observé (CMEO). Ces effets statistiques mesurés possèdent plusieurs

pour l'essai de 42 jours uniquement, (iii) des effets significatifs sur le développement (stade de Gosner) des têtards survivants dans toutes les variantes expérimentales par rapport aux témoins à la fin de l'essai. Environnement Canada (2005) donne des conseils et des orientations pour le calcul de la CLp et la CIp, qu'il faudrait suivre; les § 4.6.2.1 et 4.6.2.2 donnent d'autres conseils à cet égard. Le § 4.6.2.3 fournit des orientations sur la détermination des effets sur le développement en fonction du stade de Gosner à la fin de l'essai de 42 jours. Dans les essais statistiques utilisés pour calculer les paramètres, on peut saisir les concentrations sous forme de logarithmes. Au début, il faut appliquer des techniques de régression (v. § 4.6.2.2) aux données relatives à des concentrations multiples devant servir au calcul d'une CIp⁸⁴. Si les données devaient ne pas

inconvenients, notamment celui de dépendre des concentrations choisies pour l'essai, l'impossibilité de décrire adéquatement la courbe de réponse à l'exposition et de ne pas pouvoir donner une indication de la précision (c'est-à-dire d'interdire le calcul des limites de confiance à 95 % ou d'autres limites de confiance) [NERI, 1993; EC, 2005; Landis et Chapman, 2011]. Compte tenu de ces inconvenients, la CIp est l'effet statistique mesuré qu'il faut calculer relativement aux données sur la croissance obtenues grâce à un essai à concentrations multiples employant des grenouilles aux premiers stades de leur cycle biologique. Des approches fondées sur la régression ont également été explorées pour le paramètre du développement. Cependant, en raison de la nature ordinale des données sur le développement (Green *et al.*, 2018), et pour faciliter l'interprétation, l'UEAM a décidé d'utiliser une vérification d'hypothèse robuste et sensible pour le paramètre du développement, plutôt qu'une estimation ponctuelle.

⁸⁴ La régression est la méthode de choix pour l'estimation de la CIp. Elle comporte le filtrage mathématique des données en fonction d'un modèle choisi, puis le calcul du paramètre statistique au moyen du modèle qui décrit le mieux la relation entre la concentration d'exposition et la réaction (réponse). À l'origine, Stephenson *et al.* (2000b) ont recommandé des techniques de régression non linéaire pour plusieurs raisons, notamment : la relation existant entre la concentration d'exposition et la réaction des organismes d'essai est habituellement non linéaire; l'hétéroscédasticité des données est réduite par transformation; la technique de simulation bootstrap, plus standard, souffre de plusieurs limitations à l'égard de ces types de données; la régression linéaire peut réussir à bien représenter les distributions d'effets présentant un phénomène d'hormèse. Lorsqu'on utilise des techniques mathématiques standard, il est possible de décrire

permettre pas à elles seules le calcul des CIp de croissance grâce à la régression appropriée, on devrait tenter, à cette fin, l'interpolation linéaire de ces données à l'aide du programme ICPIN (v. § 4.6.2.2).

Pour avoir une représentation visuelle des données et vérifier si les résultats obtenus sont raisonnables par rapport aux calculs statistiques ultérieurs, il est fortement recommandé de commencer par porter sur un graphique les données brutes (le taux de mortalité, la correction des données en fonction de la longueur, le poids humide ainsi que la biomasse et le stade de développement) en fonction du logarithme des concentrations. Il faut résoudre tout écart important entre la CLp ou la CIp déterminées de façon approximative et la CLp ou la CIp calculées ultérieurement à l'aide d'un programme informatique. Le diagramme permettrait également de déterminer si on a obtenu une relation logique entre la concentration logarithmique (ou, dans certains cas, la concentration) et l'effet, une caractéristique souhaitable d'un essai valide (EC, 2005).

4.6.2.1 CLp

Lorsqu'on effectue un essai à concentrations multiples pour mesurer les effets de l'exposition de *L. pipiens* (à différents stades de développement aquatiques) à des substances ou matières d'essai (option d'essai de 14 ou 42 jours), il faut utiliser les données *quantiques* sur la mortalité pour calculer (si les données le permettent) la CLp appropriée⁸⁵. Pour estimer la CLp, il faut dresser un tableau des données sur la mortalité à la période spécifiée d'exposition correspondant à toutes les répétitions et saisir directement les données de chaque répétition aux fins d'analyse statistique. Il faut accompagner

correctement une régression en des termes qui fournissent des renseignements utiles à d'autres personnes, de prévoir les effets aux concentrations faible et élevée et d'estimer les intervalles de confiance. On peut en grande partie remédier aux lacunes de la méthode de lissage et d'interpolation (EC, 2005).

⁸⁵ Les chercheurs sont encouragés à définir des objectifs de l'étude axés sur les effets sublétaux et à choisir les concentrations d'exposition en conséquence. Ainsi, il pourrait ne pas comprendre un nombre suffisant de fortes concentrations (létales) qui permettraient le calcul de la CL50.

toute CLp calculée et signalée de ses limites de confiance à 95 %.

Environnement Canada (2005) a donné des conseils sur le choix des méthodes d'analyse statistique à appliquer aux données quantiques (la CLp), que l'on devrait consulter lorsque l'on choisit le test statistique à appliquer à de telles données pour les essais de toxicité employant des grenouilles à différents stades de développement aquatiques.

4.6.2.2 CIp

Quand on réalise un essai à concentrations multiples pour mesurer les effets de l'exposition de *L. pipiens* (à différents stades de développement aquatiques) à des substances ou matières d'essai (option d'essai de 14 ou 42 jours), il faut utiliser les données *quantitatives* représentant la croissance (longueur totale, poids humide et biomasse, corrigés en fonction des mesures au début de l'essai; v. § 4.6.1) pour calculer les CIp. La CIp est une estimation quantitative de la concentration causant un pourcentage spécifié de réduction de la longueur, du poids humide ou de la biomasse des têtards pendant l'essai.

On calcule cette concentration à un pourcentage spécifié d'inhibition (p. ex. la CI25 et/ou la CI20, qui représentent une inhibition ou réduction de 25 et de 20 %, respectivement). La valeur *p* du pourcentage est choisie par le chercheur, et elle est généralement de 25 % ou 20 %. Il faut accompagner toute CIp calculée et signalée de ses limites de confiance à 95 %.

Il faut faire ces calculs en employant les analyses de régression linéaires ou non linéaires appropriées (décrites dans le présent §). Si, cependant, les analyses de régression ne permettent pas de calculer des CIp significatives pour les trois paramètres de croissance, on devrait appliquer aux données correspondantes les analyses au moyen du programme ICPIN (décrites dans le présent §). Il faut déclarer tout mode opératoire appliqué aux données, les détails concernant toute transformation des données ainsi que la méthode statistique utilisée pour le calcul de la CIp.

Emploi de la régression. À la fin d'un essai définitif à concentrations multiples, il faut calculer les CIp (y compris leur limite respective de confiance à 95 %) pour la croissance (longueur totale, poids humide et

biomasse) de *L. pipiens* à l'aide de méthodes de régression, à condition que les hypothèses ci-dessous soient satisfaites. Un certain nombre de modèles permettent d'évaluer par régression les données (essais statistiques quantitatifs). Les modèles proposés pour l'application consistent en un modèle linéaire et en les quatre modèles suivants de régression non linéaire : exponentiel, de Gompertz, logistique, hormétique (ou hormético-logistique, c'est-à-dire logistique ajusté à l'*hormèse*)⁸⁶ (v. § 6.5.8 dans EC, 2005). Pour que les méthodes de régression puissent être utilisées, les données doivent satisfaire aux hypothèses *normalité* et d'*homoscédasticité*. Nous conseillons fortement au lecteur de consulter EC (2005) pour obtenir des conseils supplémentaires sur l'application générale de la régression linéaire et non linéaire à l'analyse des données toxicologiques *quantitatives*⁸⁷.

Dans la figure 3, on expose le processus général de l'analyse statistique et du choix du modèle de régression qui convient le mieux (linéaire ou non linéaire) aux données toxicologiques quantitatives. La sélection débute par l'examen du nuage de points ou du graphique linéaire correspondant aux données

⁸⁶ L'*hormèse* peut se manifester aux concentrations sublétales les plus faibles, les performances du groupe exposé y étant augmentées par rapport à celles du groupe témoin négatif (v. § 10.3 dans EC, 2005). Par exemple, on a observé une croissance accrue des têtards dans les échantillons contenant des concentrations d'essai faibles par rapport à ceux du témoin (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b). Pour calculer alors la CIp, il faudrait analyser les données à l'aide du modèle d'hormèse. Les effets hormétiques, pris en compte par la régression, n'introduisent pas d'erreur systématique dans l'estimation de la CIp. La CI25 estimée continue de traduire une réduction de 25 % des performances par rapport à celles du témoin. À ce jour, l'hormèse n'a pas été observée dans le paramètre de développement des têtards.

⁸⁷ Parmi les conseils fournis dans EC (2005), on compte l'utilisation d'un progiciel de statistiques polyvalent (le SYSTAT), mais c'est dans le CETIS (progiciel conçu à des fins écotoxicologiques) qu'on trouvera les modèles d'analyse de régression décrits ici. On peut acheter la version la plus récente de SYSTAT; consulter le site Web : www.systatsoftware.com/systat/. Pour obtenir la dernière version du CETIS, s'adresser à Tidepool Scientific Software, P.O. Box 2203 McKinleyville, CA 95519, États-Unis; téléphone/télécopieur : 707-839-5174; courriel : sales@tidepool-scientific.com; site Web : www.tidepool-scientific.com/Cetis/CetisStats.html.

expérimentales, pour déterminer l'allure de la courbe concentration-réponse. On compare ensuite l'allure de la courbe aux modèles disponibles, en retenant, pour examen approfondi, un ou plusieurs modèles appropriés, les mieux conformes aux données (v. fig. O.1, annexe O dans EC, 2005), pour la représentation des cinq modèles potentiels).

Une fois le ou les modèles appropriés retenus en vue de l'examen approfondi, on évalue les hypothèses relatives à la *normalité* et à l'*homoscédasticité* des *résidus*. Si, pour un ou plusieurs des modèles examinés, la régression satisfait les hypothèses, on examine les données (et la régression) pour y trouver des valeurs aberrantes. Si on en trouve, on devrait examiner la possibilité d'erreur humaine dans le procès-verbal de l'essai et les conditions expérimentales. S'il se trouve une ou plusieurs valeurs aberrantes, on devrait effectuer l'analyse avec et sans ces valeurs et comparer les résultats des analyses pour examiner l'effet des valeurs aberrantes sur la régression. Ensuite, on doit décider s'il faudrait soustraire la ou les valeurs aberrantes à l'analyse finale. Pour cette décision, on devrait prendre en considération la variabilité biologique naturelle et les éventuelles causes biologiques de l'anomalie apparente. Dans le § 10.2 de EC (2005), on trouve des conseils supplémentaires sur la présence de valeurs aberrantes et d'observations inhabituelles. Si aucune valeur aberrante n'est présente ou si on n'en soustrait aucune à l'analyse finale, le modèle qui présente la plus petite moyenne des carrés des erreurs résiduelles est retenu comme modèle optimal⁸⁸. On conseille aussi de consulter un statisticien qui connaît bien la façon de traiter les données aberrantes.

On devrait évaluer la *normalité* à l'aide du *test de Shapiro-Wilk*, décrit dans EC (2005). Pendant la régression, on peut également utiliser un graphique de probabilité normale des *résidus*, mais cela n'est pas conseillé comme test autonome de la normalité, puisque l'évaluation de la normalité ou non d'une distribution relève de la subjectivité de l'utilisateur. Si la distribution des données n'obéit pas à la loi normale, on devrait essayer un autre modèle, consulter un statisticien pour obtenir un avis

⁸⁸ On peut aussi utiliser le critère d'information d'Akaike (ou l'équivalent, comme le critère bayésien d'information) pour déterminer le meilleur ajustement du modèle.

supplémentaire sur le modèle à retenir ou effectuer la méthode d'analyse moins souhaitable qu'est l'interpolation linéaire (à l'aide du programme ICPIN, selon les indications du présent §), qui est moins souhaitable.

On devrait évaluer l'*homoscédasticité* des *résidus* à l'aide du *test de Levene*, décrit dans EC (2005) et par la comparaison des graphiques des résidus aux valeurs réelles et prévues (estimées). Le test de Levene donne une indication nette de l'homogénéité (p. ex. comme dans la figure O.2A, annexe O de EC, 2005) ou non. Si (d'après le test de Levene) les données sont *hétéroscédastiques* (c.-à-d. non homogènes), il faudrait examiner les graphiques des résidus. Si la variance subit une modification importante et si les graphiques des résidus épousent nettement la forme d'un éventail ou d'un fuseau (on trouvera un exemple à la figure O.2B, annexe O de EC, 2005), il faudrait répéter l'analyse des données au moyen d'une régression pondérée. Pour pondérer les données, on divise habituellement par l'inverse de la variance, mais d'autres méthodes sont possibles.

Avant de retenir la régression pondérée, on compare l'erreur-type de la CIp à celle que l'on obtient par régression non pondérée. Si la différence entre les deux erreurs-types excède 10 %⁸⁹, on retient comme choix optimal la régression pondérée. Cependant, si l'écart est inférieur à 10 %, on devrait consulter un statisticien sur l'application de modèles supplémentaires, compte tenu des données expérimentales. On pourrait également analyser de nouveau les données en utilisant la méthode d'analyse moins souhaitable qu'est l'interpolation linéaire (au moyen du programme ICPIN, selon les indications du présent §). On effectue cette comparaison entre la régression pondérée et celle non pondérée, pour chacun des modèles retenus, pendant que l'on s'engage dans la sélection finale du modèle (c.-à-d. du meilleur modèle et de la meilleure régression). Certaines formes non divergentes du nuage de points pourraient révéler un modèle

⁸⁹ La valeur de 10 % est purement empirique. Des tests permettent de juger objectivement de l'amélioration due à la pondération, mais ils dépassent notre propos. On ne devrait recourir à la pondération qu'en cas de nécessité, l'opération risquant de compliquer davantage la modélisation. Quand la pondération est nécessaire, on devrait consulter un statisticien.

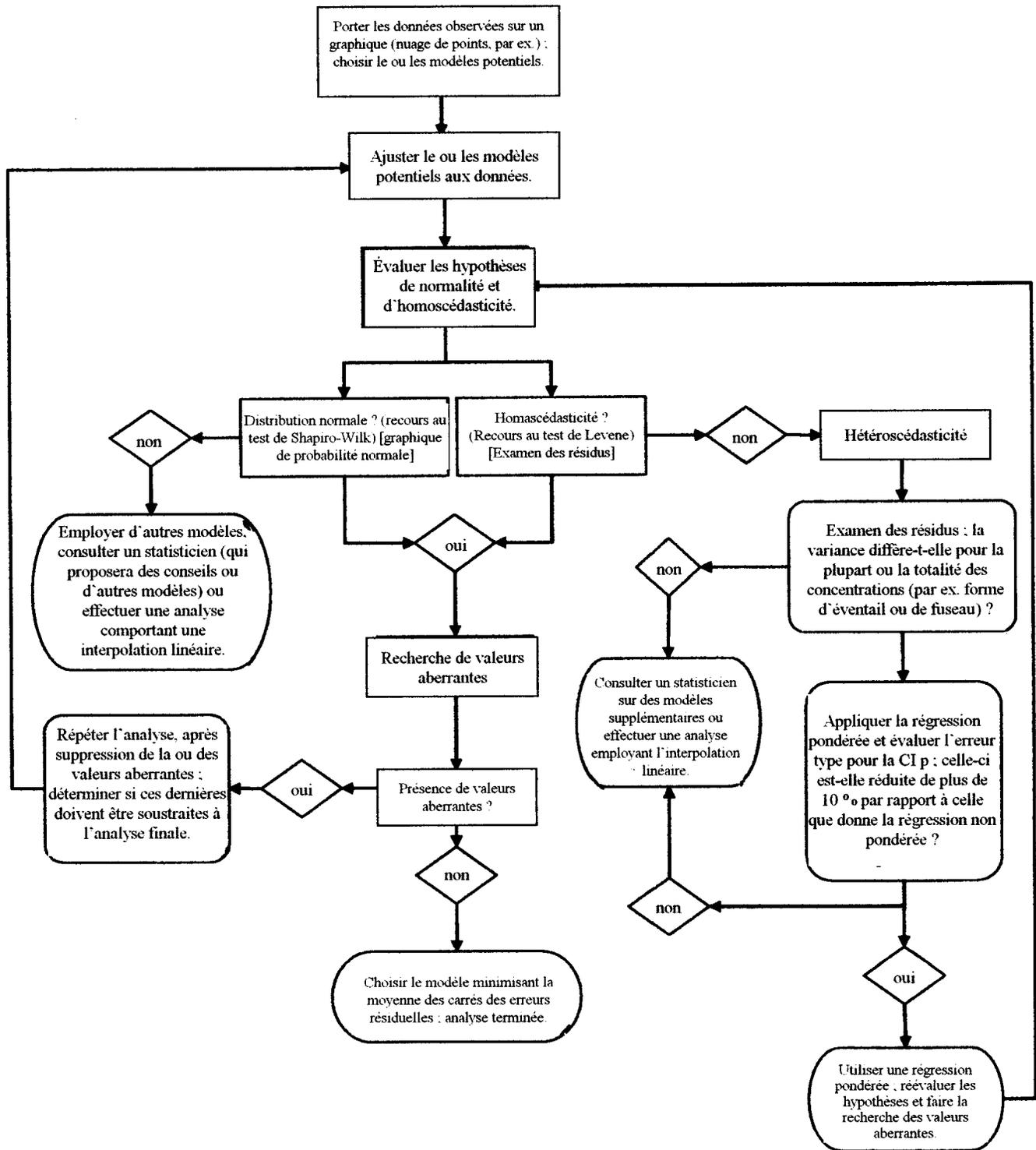


Figure 3 Processus général de l'analyse statistique et de la sélection du modèle convenant le mieux aux données quantitatives sur la toxicité (adapté et modifié d'après Stephenson *et al.*, 2000)

inadapté ou erroné (cf. fig. O.2C, annexe O dans EC, 2005), et, de nouveau, il est conseillé d'obtenir l'avis d'un statisticien sur l'application de modèles supplémentaires.

Les paramètres estimés par régression doivent être encadrés par les concentrations utilisées dans l'essai; l'extrapolation des paramètres au-delà de la concentration d'essai maximale ne constitue pas une pratique acceptable (EC, 2005).

Interpolation linéaire au moyen du programme ICPIN. Si les régressions des données relatives aux effets mesurés (v. texte précédent) n'aboutissent pas à une CIp acceptable pour la croissance (c.-à-d. si les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité ne peuvent être satisfaites), on devrait appliquer l'interpolation linéaire au moyen du programme informatique dit *ICPIN*. Ce programme (Norberg-King, 1993; USEPA, 2002) est libre de droits et il est disponible auprès de l'EPA des États-Unis. Il fait par ailleurs partie de la plupart des logiciels employés en *écotoxicologie*, y compris TOXSTAT (1996) et CETIS (2020). Les instructions d'origine du programme ICPIN dues à l'USEPA sont claires et facilitent l'emploi du programme (Norberg-King, 1993)⁹⁰. Une version antérieure du programme s'appelait BOOTSTRP.

L'analyse par le programme ICPIN n'exige pas des nombres égaux de répétitions aux différentes concentrations. On estime la CIp par lissage des données, au besoin, puis par utilisation des deux données encadrant la CIp choisie (USEPA, 2002, annexe M). Pour calculer la CIp, des concentrations d'essai doivent lui être inférieure et supérieure; ces deux concentrations devraient agir assez près de la valeur choisie de p, de préférence à moins de 20 % de distance. À l'heure actuelle, le programme n'emploie pas l'échelle logarithmique des concentrations, de sorte que les utilisateurs canadiens doivent saisir les concentrations sous forme de logarithmes. Certains progiciels du

⁹⁰ Les instructions de Norberg-King (1993) entraînent parfois la confusion relativement à l'identité des « répétitions », terme employé de manière à s'appliquer à des nombres d'organismes individuels se trouvant dans le même récipient. Ce lapsus ne nuit pas au fonctionnement du programme. Certains programmes du commerce ont été moins conviviaux pour la saisie et l'analyse des données.

commerce possèdent, comme option générale, la transformation logarithmique, mais on devrait s'assurer que les chiffres ainsi calculés sont effectivement retenus lorsque l'on applique le programme ICPIN. Ce dernier estime les limites de confiance par une technique particulière dite « bootstrap », parce que les méthodes usuelles ne sont pas valides. Cette technique effectue de nombreux rééchantillonnages dans les mesures originelles. On doit spécifier le nombre de rééchantillonnages, qui peut varier de 80 à 1 000. Nous en recommandons au moins 400, et 1 000 seraient avantageux⁹¹. On devrait tracer le graphique de la réduction de la longueur totale, du poids humide et de la biomasse qui sont vivants en fonction du logarithme des concentrations, pour vérifier les estimations mathématiques et procurer une estimation visuelle de la nature des données (EC, 2005).

Si le programme ICPIN est appliqué à des données révélant un effet hormétique, un lissage inhérent des données pourrait modifier la valeur correspondant au témoin et décaler l'estimation de la CIp. En conséquence, avant d'appliquer l'analyse statistique, on devrait systématiquement remplacer par la valeur témoin les valeurs hormétiques correspondant aux faibles concentrations. Cette façon de procéder est considérée comme un expédient provisoire, tant qu'une meilleure approche ne sera pas mise au point (v. Option 4 dans le § 10.3.3 de EC, 2005). La correction est appliquée à toute concentration d'essai dont l'effet moyen correspondant (c.-à-d. la moyenne géométrique des moyennes des répétitions) est supérieur (« meilleur ») à la moyenne du témoin. Pour appliquer cette correction, on remplace les mesures de la croissance observée dans les répétitions correspondant à la concentration ou aux

⁹¹ Le programme ICPIN souffre de certaines lacunes, ce qui explique pourquoi, dans le présent document, on ne le recommande que dans les cas où la régression ne donne pas une CIp acceptable. Employant les données de façon inefficace, sa méthode d'interpolation est sensible aux particularités des deux concentrations utilisées. Parce qu'il n'utilise pas le logarithme de la concentration, le programme favorise systématiquement une valeur majorée de la CIp. Malgré une modification de la méthode « bootstrap » qui remédie désormais au problème des limites de confiance excessivement étroites, les régressions estiment cependant plus précisément la CIp et ses limites de confiance à 95 % (EC, 2005) [v. § 4.6.2.2].

concentrations hormétiques par la moyenne des répétitions du témoin. La moyenne géométrique de cette ou de ces concentrations sera alors identique à celle du témoin.

4.6.2.3 Paramètre du développement

Quand on réalise un essai à concentrations multiples de 42 jours pour mesurer les effets sur les stades de développement aquatiques de *L. pipiens*, il faut utiliser les données *ordinales* représentant le développement (stade de Gosner) pour évaluer les effets sur le développement dans les variantes expérimentales par rapport aux témoins. Le résultat de ces essais permettra de déterminer les variantes expérimentales significativement différentes des témoins. Le stade de Gosner moyen pour chaque répétition est saisi directement aux fins d'analyse statistique. L'essai statistique recommandé pour déterminer les effets de la variante expérimentale sur le stade de Gosner consiste en l'application avec correction du test de Jonckheere-Terpstra, et de préférence le test de Jonckheere-Terpstra à quantiles multiples du 20^e au 80^e centile pour tenir compte des changements dans le profil de distribution (EC, 2005; OCDE, 2009; Green *et al.*, 2018; John W Green Ecostatistical Consulting, 2021)⁹². Bien que d'autres analyses statistiques soient disponibles pour les données sur le développement, Environnement et Changement climatique Canada a de l'expérience dans l'utilisation du test de Jonckheere-Terpstra. En outre, le calcul de la puissance a déterminé que le plan d'expérience décrit au § 4.2 pour l'essai de 42 jours a une puissance acceptable (c.-à-d. ≥ 80 %) pour détecter une différence de ≥ 2 stades de Gosner entre les variantes expérimentales et le ou les témoins⁹³, lorsque le test de Jonckheere-Terpstra ou

⁹² Au moment de la publication, le test de Jonckheere-Terpstra avec correction était disponible en tant qu'option d'essai de comparaison entre les groupes dans CETIS (versions 1.9.7 et 2.1), le progiciel couramment utilisé dans les laboratoires de toxicologie au Canada.

⁹³ Au cours de l'élaboration de la méthode d'essai, les analystes ont noté qu'on peut s'attendre à des différences de ± 1 stade de Gosner en raison de l'emplacement de l'organisme ou de la variabilité interanalystes lors de la détermination du stade des organismes d'essai à certains stades de développement. Pour ne pas avoir à déclarer un effet significatif provoqué par la variante expérimentale et qui pourrait découler d'une erreur expérimentale, on a choisi des différences de ≥ 2 stades de Gosner pour le calcul de la puissance. Bien qu'on puisse choisir les effets

le test de Jonckheere-Terpstra à quantiles multiples est utilisé (John W Green Ecostatistical Consulting, 2021; v. § 4.6.2.4).

4.6.2.4 Calcul de la puissance

Un facteur important dont il faut tenir compte dans l'analyse des résultats des essais de toxicité est la possibilité de faux positifs (c.-à-d. de déclarer qu'une eau propre est contaminée : erreur de type I) ou de faux négatifs (c.-à-d. de déclarer qu'une eau contaminée est propre : erreur de type II). Les scientifiques sont habituellement prudents dans le choix du niveau de signification pour la tolérance des résultats faux positifs (erreurs de type I) et ils le fixent habituellement à $p = 0,05$ ou $0,01$. Le plus souvent, lorsqu'ils se conforment à un plan d'expérience précis, ils ne tiennent pas compte du lien entre puissance, variation et amplitude de l'effet et omettent de préciser la valeur de l'erreur de type II (β). Plusieurs facteurs influent sur la puissance statistique, notamment :

- la variabilité des échantillons réitérés représentant la même variante expérimentale;
- α (c.-à-d. la probabilité de commettre une erreur de type I);
- l'ampleur de l'effet (c.-à-d. l'ampleur de l'effet véritable que l'essai cherche à déterminer);
- n (c.-à-d. le nombre de répétitions utilisées dans l'essai).

Les guides d'Environnement Canada sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité (EC, 2005) renferment de plus amples renseignements et conseils sur les erreurs des types I et II.

Dans les domaines scientifiques fondés sur la recherche, l'analyse de puissance est particulièrement utile au moment de l'établissement du plan d'expérience préliminaire (Hoenig et Heisey, 2001; Lenth, 2007; Newman, 2008). Dans le cas présent, on exécute un essai exploratoire afin de déterminer l'écart-type approximatif (variation) et de diagnostiquer les problèmes qui risquent de surgir dans l'exécution de l'essai en général. D'autres facteurs du calcul de la puissance, comme l'ampleur

biologiquement significatifs en fonction des objectifs du projet, les chercheurs sont encouragés à considérer que des changements de ≥ 2 stades de Gosner sont importants sur le plan biologique.

de l'effet et le nombre de répétitions, peuvent ensuite être envisagés en regard de la variabilité en vue d'optimiser le plan d'expérience définitif (p. ex. le nombre de répétitions nécessaires pour détecter un effet d'une certaine ampleur).

Dans la mise au point de méthodes d'essai normalisées, le calcul de la puissance a pour objectif premier l'optimisation du plan d'expérience ou du moins l'estimation de la puissance du plan en cours⁹⁴. Toutefois, il faudrait généralement prendre en considération un ensemble de données nettement plus étoffé qu'une seule estimation de la variation et de l'ampleur de l'effet. Par exemple, les spécialistes des méthodes d'essai pourraient recueillir un certain nombre d'estimations de la variation auprès de différents laboratoires et à partir de différents scénarios de contamination (Thursby *et al.*, 1997; Van der Hoeven, 1998; Denton *et al.*, 2011, 2019).

Les données des essais interlaboratoires et du LEEA ont servi à estimer la puissance permettant de détecter un changement dans le développement (c.-à-d. le stade de Gosner) dans le cadre de l'essai de toxicité de 42 jours pour les amphibiens. On n'a effectué aucun calcul de la puissance pour l'essai de 14 jours, car la détermination d'effets significatifs sur le développement n'est pas un paramètre requis. On se sert du plan d'expérience de l'essai de 42 jours, décrit dans le § 4.2, pour calculer la puissance, avec dix têtards par répétition, quatre répétitions par concentration et huit répétitions par témoin (John W Green Ecostatistical Consulting, 2021). Dix essais ont permis d'estimer la variabilité, des essais effectués avec des substances chimiques, notamment la thyroxine (trois essais), le perchlorate (trois essais), le triclosan (deux essais), un pesticide (VisionMAX^{MC}, principe actif : glyphosate; un essai), et un produit chimique inconnu (un essai). Dans les études de simulation, différentes distributions de données ont été évaluées, y compris des distributions avec des différences dans la

⁹⁴ En 2010, l'USEPA a mis au point une approche d'analyse des données appelée test de toxicité significative (TTS) (USEPA, 2010). Un TTS permet de tester une hypothèse d'après la bioéquivalence, une notion largement utilisée dans la mise au point et l'évaluation de médicaments. Le TTS est évoqué ici parce que le calcul de la puissance et le TTS ont certains buts communs (p. ex. expression *a priori* des erreurs des types I et II) et un contexte semblable (application d'essais normalisés).

variabilité, des différences dans le stade de développement attendu à la fin de l'essai et des différences dans la troncature des données. On a maintenu la valeur alpha à 0,05 tout au long de l'étude et on a utilisé une *ampleur cible avec effet* de ≥ 2 stades de Gosner. Dans ces conditions, on a évalué les propriétés de trois essais statistiques différents (le test de Jonckheere-Terpstra, le test de Jonckheere-Terpstra à quantiles multiples et le test de Rao-Scott Cochran Armitage par tranches). On a réalisé la totalité des calculs de puissance avec le logiciel SAS (John W Green Ecostatistical Consulting, 2021).

Le test de Jonckheere-Terpstra ou le test de Jonckheere-Terpstra à quantiles multiples représentent les tests statistiques recommandés, en raison de leur facilité d'utilisation et d'interprétation et de leur puissance acceptable. Ces deux tests ont permis d'atteindre une puissance de 80 % dans la plupart des simulations⁹⁵ utilisées dans l'étude de simulation. Le test de Jonckheere-Terpstra à quantiles multiples constitue l'option privilégiée, car il est capable d'évaluer les changements à plusieurs quantiles dans les données, alors que le test de Jonckheere-Terpstra ne peut évaluer que les changements dans la moyenne, c.-à-d. le 50^e quantile. Grâce au test de Jonckheere-Terpstra à quantiles multiples, les chercheurs sont en mesure de fonder leurs conclusions statistiques sur un plus large éventail de données. Il faudrait noter que l'augmentation du nombre d'organismes d'essai par répétition (p. ex. 20 ou 40 organismes par répétition) accroît la puissance du test (John W Green Ecostatistical Consulting, 2021).

4.6.3 Autres plans d'expérience

Bien que la méthode d'essai décrite dans le présent document présente des méthodes normalisées permettant de mesurer la capacité de survie, la croissance et le développement des têtards exposés à des échantillons d'eau dans le cadre d'expositions de 14 et 42 jours, Environnement et Changement climatique Canada reconnaît la valeur des

⁹⁵ Certaines simulations ont supposé une grande variabilité des données et, dans ces cas, les essais statistiques n'ont pas atteint une puissance de 80 %. Ce niveau élevé de variabilité n'a toutefois pas été observé fréquemment dans les ensembles de données d'Environnement et Changement climatique Canada (John W Green Ecostatistical Consulting, 2021).

paramètres supplémentaires pouvant être ajoutés à la conception actuelle de l'essai, comme l'indique ce §. Le présent § décrit en outre d'autres plans d'expérience qui peuvent être utilisés avec *L. pipiens* et qui peuvent s'avérer plus pertinents pour d'autres objectifs d'étude. Des paramètres supplémentaires (p. ex. l'histopathologie ou l'expression génétique) et d'autres plans d'expérience (p. ex. une durée d'essai prolongée ou des récipients d'exposition modifiés⁹⁶) ne doivent pas nécessairement entrer en conflit avec le plan d'expérience principal décrit dans le présent document de méthode d'essai⁹⁷. Ils sont plutôt décrits ici pour permettre à un chercheur ou à un organisme de réglementation d'ajouter ou de modifier légèrement le plan d'expérience pour répondre aux objectifs particuliers de l'étude. En intégrant les paramètres supplémentaires au plan d'expérience normalisé ou en modifiant légèrement le plan d'expérience, les chercheurs peuvent éviter de répéter les expositions avec *L. pipiens* et, ce faisant, appliquer le principe de « réduction » des 3 R dans les objectifs de l'essai (v. aussi le § 4.9).

Les chercheurs pourraient également axer leur travail sur les répercussions sur une autre espèce d'anoures présentant un intérêt écologique pour un site contaminé particulier. On pourrait utiliser d'autres espèces de grenouilles avec l'une ou l'autre des options d'essai décrites dans le présent document de méthode d'essai, ou avec d'autres plans d'expérience décrits dans le présent §, bien qu'il faille confirmer la modification de certains modes opératoires et/ou conditions (p. ex. volumes d'essai, température d'essai, durée de l'essai). On recommande de procéder à un ou plusieurs essais

⁹⁶ Dans le cadre d'une expérience où l'on s'est intéressé aux réactions individuelles des têtards, le LEEA a placé chaque têtard dans un récipient d'essai séparé. Cette approche favorise la surveillance des réactions individuelles de chaque têtard; cependant, ce type d'exposition demande beaucoup de temps et de travail et peut ou non fournir de meilleurs renseignements que l'utilisation de plusieurs têtards par réservoir (P. Jackman, Environnement et Changement climatique Canada, Moncton [Nouveau-Brunswick], communication personnelle, 2020).

⁹⁷ Environnement et Changement climatique Canada a acquis une certaine expérience dans l'utilisation de tous les modèles d'essai décrits dans ce § au cours de l'élaboration des essais à 14 et 42 jours décrits dans le présent document de méthode d'essai.

préliminaires (c.-à-d. en utilisant de l'eau témoin/de dilution) avec les ajustements de mode opératoire nécessaires afin de démontrer que les conditions d'essai sont appropriées et que les critères de validité de l'essai décrits ici sont réalisables avant de l'utiliser pour mesurer la toxicité d'une substance ou d'une matière d'essai potentiellement contaminée selon l'une ou l'autre des options d'essai décrites dans le présent document (avec ou sans modification). Cette méthode n'a été validée qu'avec *L. pipiens*, mais la grenouille des bois (*Lithobates sylvaticus*) et l'ouaouaron (*Lithobates catesbeiana*) d'Amérique du Nord ont été utilisées dans deux laboratoires d'Environnement et Changement climatique Canada (LEEA et LEEPY) pour la recherche et pendant l'élaboration de cette méthode (v. § 1.4).

4.6.3.1 Durée de l'essai

Deux options de durée d'essai (14 jours et 42 jours) sont décrites dans le présent document de méthode d'essai et le choix de l'option la plus appropriée dépend des objectifs de l'étude et de la nature de la substance ou de la matière d'essai (v. § 4.3.1). Ces essais sont conçus pour déterminer les effets sur *L. pipiens* à différents stades de leur développement et ont été validés en utilisant des têtards au SG 25 (pour l'essai de 14 jours) et au SG 28/29 (pour l'essai de 42 jours) au début de l'essai (v. § 2.1). Une exposition chronique plus longue couvrant un plus grand nombre de stades de développement précoces de *L. pipiens* pourrait inclure une combinaison des essais de 14 jours et de 42 jours pour un essai de 56 jours commençant par des têtards au SG 25. Cette exposition de 56 jours couvrirait la plupart des stades larvaires des grenouilles, en commençant par les têtards qui se nourrissent activement (SG 25) et en finissant avec certains têtards au SG 42, marqués par l'émergence des membres antérieurs (v. § 2.1 et la fig. 2.2).

Opter pour un essai de 56 jours en commençant par des têtards au SG 25 consiste à réaliser l'essai de 14 jours en démarrant avec des têtards au SG 25 et à réaliser également l'essai de 42 jours en employant de nouveaux organismes au SG 28/29. L'avantage de cette autre approche par rapport à l'exposition continue de 56 jours décrite précédemment est que le stade initial de Gosner des organismes d'essai est en fait « réinitialisé » ou « remis à zéro » avant la

deuxième phase d'exposition (essai de 42 jours). Certains têtards présentent un retard de développement et pourraient ne montrer aucun signe de développement au-delà du SG 25 ou de développement jusqu'à la métamorphose. Ce retard dans le développement peut créer des difficultés dans l'interprétation des données, en particulier pour les expositions plus longues. Cette approche permet de réduire la variabilité créée par les différences de taux de développement des têtards en « réinitialisant » le stade de développement des organismes d'essai avant la partie de l'essai s'échelonnant sur 42 jours. Cette approche permet également de « réinitialiser » la mortalité des témoins si cette dernière se rapproche des limites acceptables à la fin de l'essai de 14 jours. Elle présente aussi l'avantage d'offrir un délai supplémentaire pour l'évaluation des paramètres de croissance (c.-à-d. après 14 jours et après 42 jours).

Si une étude le justifie, l'essai peut commencer par des embryons⁹⁸ ou des individus à des stades

⁹⁸ Si l'on souhaite commencer l'essai par des embryons, on peut utiliser des enceintes d'incubation semblables à celles utilisées dans l'essai d'Environnement Canada sur la truite arc-en-ciel aux premiers stades de développement (EC, 1998) afin de contenir les embryons à l'intérieur des récipients d'essai, de permettre l'écoulement de la solution d'essai autour des embryons et de permettre le renouvellement des solutions d'essai avec un minimum de perturbation (Yee *et al.*, 1996). L'enceinte d'incubation est constituée d'un béccher en plastique Tri-Pour^{MC} de 800 mL (ou plus) dont les parois sont légèrement effilées. Une série de fentes horizontales sont pratiquées sur les côtés, près du fond, pour permettre la circulation des solutions d'essai dans le béccher. On perce un trou circulaire au centre du fond du béccher et on insère un tube amovible « à pression » de 5 cm de long, découpé dans une pipette volumétrique standard jetable de 10 mL en polystyrène, dans le trou (EC, 1998). L'enceinte d'incubation est suspendue dans un récipient d'essai, et les embryons sont maintenus dans les enceintes d'incubation de l'essai jusqu'à ce qu'ils deviennent des têtards nageant activement (SG 25). À ce stade, les têtards peuvent nager seuls hors des enceintes d'incubation; cependant, une fois que tous les œufs ont éclos (environ sept jours après l'introduction des œufs dans les enceintes d'incubation), on fait basculer délicatement les têtards de l'enceinte d'incubation au récipient d'essai (v. § 4.2), et on retire les enceintes d'incubation. Des précautions sont prises pour éviter de manipuler inutilement les embryons, de les heurter ou de les faire tomber lors de leur transfert

larvaires précoces (têtards), et la durée d'exposition peut varier en fonction des objectifs de l'étude. Les études sur l'exposition chronique couvrant l'ensemble des premiers stades de développement de *L. pipiens* pourraient commencer par des embryons ou des têtards récemment éclos (c.-à-d. au stade 19 ou 20 de Gosner) et se poursuivre jusqu'à l'achèvement de la métamorphose et de la résorption de la queue (c.-à-d. au stade 46 de Gosner; environ 90 à 120 jours après le début de l'essai), ou au moins jusqu'à l'apparition des membres antérieurs (c.-à-d. au stade 42 de Gosner; environ 42 à 90 jours après le début de l'essai). Lors d'un essai couvrant ces derniers stades de la métamorphose (stades 43-46), les organismes subiraient une réabsorption de la queue et une augmentation de la taille de la bouche; les structures permettant aux larves de s'alimenter sont alors remplacées par les mâchoires et la langue des adultes (cf. fig. 2.2). Les membres antérieurs et postérieurs deviennent également fonctionnels à ces derniers stades du développement (McDiarmid et Altig, 1999). Si l'essai doit se poursuivre jusqu'à la résorption de la queue, il faudrait ajouter un substrat ou une plateforme (pour imiter la terre terrestre) aux réservoirs afin d'éviter que les spécimens métamorphes ne se noient. Une autre solution consisterait à faire descendre le niveau d'eau et à incliner les récipients d'essai pour permettre aux spécimens métamorphes de sortir de l'eau. Pour les expositions plus courtes axées sur les premiers stades de développement (c.-à-d. en fonction des objectifs de l'étude), on pourrait démarrer l'essai avec des embryons (c.-à-d. <48 h, stade 10 à 12 de Gosner) et le poursuivre jusqu'à ce que les têtards nagent activement (stade 25 de Gosner; environ

vers les enceintes d'incubation (v. § 2.3.7). À l'intérieur des enceintes, l'espace des embryons doit être adéquat pour assurer un échange d'oxygène suffisant et l'élimination des déchets métaboliques. Il faudrait les répartir le plus uniformément possible sur le fond de chaque enceinte d'incubation. Au cours du dénombrement, on peut surélever doucement l'enceinte d'incubation jusqu'à ce qu'elle se trouve juste en dessous de la surface de la solution d'essai si cela est nécessaire aux fins d'observation, mais les embryons devraient rester dans la solution d'essai à tout moment. Pour les embryons, des observations quotidiennes du nombre d'éclosions et du stade de Gosner sont effectuées et consignées.

7 jours après le début de l'essai). Ce type d'exposition viserait les tout premiers stades larvaires qui ne sont pas couverts par les expositions de 14 ou 42 jours décrites dans le présent document de méthode d'essai (v. note de bas de page 98 pour plus de détails sur l'utilisation d'embryons dans les essais de toxicité).

Les essais peuvent être interrompus après une durée d'exposition déterminée, comme le décrit le présent document pour les essais de 14 et 42 jours. Il est également possible de mettre fin à l'essai en fonction du stade et d'y mettre fin lorsqu'un certain pourcentage (p. ex. 80 %) de têtards du groupe témoin atteignent un stade de développement précis (p. ex. SG 42 ou SG 46). En fonction des objectifs de l'étude, cela peut être avantageux lorsque l'on s'intéresse au taux de développement en tant que paramètre (p. ex. pour les études sur les perturbations endocriniennes) ou lorsqu'il y a un intérêt à comparer les paramètres chez des organismes où le stade de développement est constant⁹⁹. Ces essais peuvent être assez longs, car les taux de développement varient considérablement, et l'imprévisibilité de la durée des essais dans le cadre de cette approche peut constituer un défi pour les laboratoires du point de vue de la planification et de la gestion des ressources.

Les durées d'exposition peuvent être allongées (ou raccourcies) en fonction des paramètres intraorganiques qui présentent un intérêt, l'idéal étant d'adapter le stade des organismes utilisés au début de l'essai et la durée de l'essai à l'effet ou aux effets étudiés. Par exemple, une étude axée sur les effets sur l'organogenèse porterait sur les jeunes embryons (SG 1-25), mais pour étudier les effets sur la thyroïde ou la métamorphose, l'essai devrait inclure le stade où la thyroïde devient active et

⁹⁹ Des paramètres basés sur le stade de développement peuvent être ajoutés à l'essai standard de 42 jours. Par exemple, si un laboratoire souhaite poursuivre les expositions jusqu'à ce que 80 % des organismes témoins atteignent le SG 42, il peut procéder à une fin d'essai « provisoire » à 42 jours en effectuant toutes les mesures standard sur des têtards vivants et en évaluant la validité de l'essai décrite dans le présent document de méthode d'essai. Les têtards qui n'ont pas atteint le SG 42 pourraient ensuite être replacés dans les solutions d'exposition jusqu'à ce que 80 % des têtards témoins atteignent le SG 42.

sensible (SG 29) (D. Fort, Fort Environmental Laboratories Inc., Stillwater [Oklahoma], communication personnelle, 2020). Le chercheur devrait également s'assurer que les organes présentant un intérêt particulier pour l'histologie ou l'expression génétique sont bien développés chez les têtards d'essai avant de mettre fin à l'exposition. Par exemple, il est difficile de déterminer le sexe des têtards avant le SG 36 (Robinson *et al.*, 2020); il faudrait donc ajuster les durées d'exposition pour s'assurer que les têtards ont des gonades et des testicules bien développés si l'on souhaite déterminer le sexe des têtards ou l'histologie des gonades.

4.6.3.2 Paramètres intraorganiques ou non apicaux

On constate une utilisation accrue de paramètres non classiques comme solution de rechange pour mesurer les effets des toxiques sur les organismes d'essai ou pour déterminer des effets de mode d'action précis. Le § 1.4 résume des exemples d'essais sur les amphibiens qui utilisent d'autres paramètres (p. ex. le comportement, la physiologie, l'expression génétique, la perturbation endocrinienne) pour évaluer les répercussions, ou comme outil de dépistage ou de prévision de l'impact.

Comme il n'est pas nécessaire de mesurer le poids sec à la fin des essais décrits ici (v. § 4.5 et 4.6.1), des échantillons de tissus peuvent être prélevés à la fin des essais de 14 ou 42 jours (ou pendant l'essai en utilisant des organismes d'essai supplémentaires) pour l'analyse histologique et/ou l'analyse de l'expression génétique, en fonction des objectifs de l'étude. Il faut être prudent et bien comprendre les objectifs de l'étude lors du traitement des têtards à la fin de l'exposition, car différentes variantes expérimentales et techniques de conservation sont probablement nécessaires et dépendent des paramètres^{100,101}.

¹⁰⁰ Dans une étude menée par Holloway *et al.* (2004), les effets de deux composés anesthésiques ou euthanasiantes, le MS-222 (méthanesulfonate de tricaine) et l'huile de clou de girofle (eugénol), sur les profils hormonaux sanguins ont été comparés à l'aide de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'étude a révélé de grandes différences dans certaines hormones sanguines en fonction du composé utilisé, ce qui souligne l'importance

Ces types d'essai peuvent fournir de précieux renseignements sur le mode d'action à l'origine des effets apicaux observés, ou fournir des indications

d'étudier les effets potentiels des composés euthanasiant sur les paramètres du plasma sanguin si les analyses du sang et des tissus doivent être intégrées aux paramètres de l'étude.

¹⁰¹ L'utilisation de techniques de conservation permet de préserver les organismes d'essai et d'évaluer ultérieurement d'autres paramètres en complément de la méthode d'essai normalisée. Différents paramètres d'essai mesurés sur différents tissus ou organismes entiers nécessiteraient probablement des techniques de conservation différentes, en fonction des objectifs de l'étude. Pour l'histologie thyroïdienne, on a conservé les têtards dans le fixateur de Davidson, puis on les a rincés et transférés dans du formol tamponné neutre à 10 % conformément aux modes opératoires décrits dans le document d'orientation de l'OCDE (2007) « Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology Part 1: Technical Guidance for Morphologic Sampling and Histological Preparation » [Document d'orientation sur l'histologie de la thyroïde des amphibiens – Partie 1 : Conseils techniques pour l'échantillonnage morphologique et la préparation histologique] (Experimental Pathology Laboratories, Inc., 2019). Pour l'histologie des gonades, les têtards ont été fendus de l'anus vers le haut de l'abdomen à l'aide de ciseaux pointus et tranchants et placés dans du CALEX® pendant 24 heures, puis transférés dans de l'alcool (LEEA, 2009). Pour mesurer les stéroïdes ou les hormones, on a congelé les têtards dans de l'azote liquide et conservé ces derniers à -84 °C (LEEA, 2009). Pour l'analyse génomique, les têtards ont été disséqués pour retirer l'organe d'intérêt. Les organes ont été conservés dans du RNAlater®, stockés à 4 °C pendant 24 heures, puis transférés à -84 °C pour une conservation plus longue. Tous les outils ont été lavés dans une solution de pyrocarbonate de diéthyle (DEPC) à 1 %, puis de peroxyde d'hydrogène à 5 % dans du DEPC, et de nouveau dans du DEPC (LEEA, 2009). On a placé les spécimens métamorphes dans du formol ou du CALEX® pendant 24 heures, puis on les a transférés dans de l'alcool pour préserver les tissus en vue d'une analyse ultérieure (LEEA, 2004, 2006). Pour l'analyse EcoToxChip, les techniques de conservation recommandées sont les suivantes : i) conservation des têtards entiers par congélation rapide dans l'azote liquide et stockage à -80 °C, ou ii) pour les organismes d'essai plus grands, dissection et conservation des tissus d'intérêt dans du RNAlater® à -80 °C, -20 °C ou à température ambiante (D. Crump, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa [Ontario] et N. Hogan, Université de la Saskatchewan, communication personnelle, 2020).

sur les effets suborganiques lorsque des effets manifestes sur la survie, la croissance ou le développement n'ont pas été observés. Par exemple, les changements dans la métamorphose ne sont pas toujours directement liés à la perturbation de la thyroïde (D. Fort, Fort Environmental Laboratories Inc., Stillwater [Oklahoma], communication personnelle, 2020). Le lien entre un développement accéléré ou retardé et l'histopathologie thyroïdienne, l'activité de l'ARN ou un autre paramètre mieux conçu pour déterminer le mode d'action, peut fournir une image beaucoup plus claire.

Plusieurs études d'Environnement et Changement climatique Canada ont été menées dans lesquelles le plan d'expérience pour l'exposition décrite dans le présent document de méthode d'essai a été associé à des paramètres histologiques d'intérêt, notamment des frottis sanguins cardiaques prélevés pour les profils leucocytaires, des reins prélevés pour l'évaluation des parasites, des foies prélevés pour la détermination de l'indice hépatosomatique et du stress oxydatif, et des gonades prélevées pour le rapport de masculinité et l'histologie gonadique (Robinson *et al.*, 2019a, 2020, 2021). Certaines de ces études ont montré que les signes de stress physiologique observés au niveau intraorganisme ne se traduisaient pas nécessairement par des effets manifestes sur l'organisme entier (p. ex. la survie, la croissance, le développement, la morphologie).

Dans certains cas, les effets observés à l'aide des paramètres apicaux classiques pourraient ne pas se traduire par les changements attendus au niveau intraorganique. Dans une étude récente, Environnement et Changement climatique Canada a demandé à Experimental Pathology Laboratories d'effectuer une évaluation histopathologique des glandes thyroïdiennes prélevées sur des têtards non sexués de *L. pipiens* qui avaient été exposés à 0,67 µg/L de thyroxine pendant deux semaines dans le cadre d'une exposition à renouvellement intermittent¹⁰². D'après la stadification de Gosner

¹⁰² Les glandes thyroïdiennes ont été évaluées sur des parties du corps entier. On a conservé les têtards dans le fixateur de Davidson, puis on les a rincés et transférés dans du formol tamponné neutre à 10 %, conformément aux modes opératoires décrits dans la publication de l'OCDE (2007) intitulée « Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology Part 1: Technical Guidance for Morphologic and Histological Preparation »

(paramètre apical), l'exposition à la thyroxine était clairement associée à un développement métamorphique accéléré, comme prévu; cependant, il n'y avait pas de signe visible d'atrophie de la glande thyroïde, comme on s'y attendait. La thyroxine étant connue pour renforcer l'activité thyroïdienne et accélérer la métamorphose, ces résultats étaient probablement dus au jeune âge des têtards exposés (Experimental Pathology Laboratories Inc., 2019).

On peut également utiliser des échantillons d'organismes entiers ou de tissus prélevés à la fin de l'essai (ou pendant l'essai en utilisant des organismes supplémentaires) pour analyser l'expression génétique. Plusieurs études d'Environnement et Changement climatique Canada ont exposé des têtards d'ouaouaron (*L. catesbeiana*) d'Amérique du Nord et de rainette du Pacifique (*Pseudacris regilla*) à diverses substances chimiques, après quoi des organes (p. ex. le cerveau et le foie) et des tissus (p. ex. le système olfactif et la queue) ont été prélevés pour une analyse de la transcription des gènes (c.-à-d.. la réaction en chaîne de la polymérase quantitative en temps réel à transcription inversée [RT-qPCR]) (v. § 1.4). Des paramètres morphométriques et comportementaux ont également été recueillis après l'exposition des têtards afin d'établir le lien les réactions de l'organisme entier et paramètres d'expression génétique (Veldhoen *et al.*, 2006, 2014; Gunderson *et al.*, 2011; Heerema *et al.*, 2018). Des biopsies peuvent être prélevées sur des têtards vivants pour permettre l'évaluation directe des contaminants préoccupants dans les tissus (p. ex. essais *in vitro* sur la nageoire caudale de l'espèce d'élevage en utilisant des têtards de *L. catesbeiana* pour l'essai sur la

(Document d'orientation sur l'histologie de la thyroïde des amphibiens – Partie 1 : Conseils techniques pour l'échantillonnage morphologique et la préparation histologique). On a incorporé les têtards dans de la paraffine et prélevé des sections de 4 à 6 microns d'épaisseur dans le plan longitudinal horizontal à des intervalles de 4 à 10 microns, en fonction de la taille du têtard. Les coupes ont été placées sur des lames de verre avec des bandelettes de couverture en verre et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H et E), conformément aux méthodes de routine utilisées pour *Xenopus laevis* (OCDE, 2007; Grim *et al.*, 2009). Les coupes ont été évaluées par un pathologiste à l'aide d'un microscope en champ clair (Experimental Pathology Laboratories, Inc., 2019).

nageoire caudale : Hinthner *et al.*, 2010b; Veldhoen *et al.*, 2014). On peut aussi prélever des organismes entiers ou des tissus et mesurer les contaminants préoccupants dans le cadre d'analyses de la charge corporelle (Marlatt *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2020).

On peut également prélever des échantillons de tissus dans le cadre d'une analyse EcoToxChips, un outil de toxicogénomique de nouvelle génération servant à déterminer les mécanismes d'action moléculaires précis pour l'évaluation des substances chimiques préoccupantes et la gestion de l'environnement (Basu *et al.*, 2019). L'outil EcoToxChip est une microplaque utilisée pour la RT-qPCR contenant de nombreuses cibles génétiques et des mesures de contrôle de qualité. Cet outil est conçu pour analyser le tissu hépatique ou des organismes entiers, en fonction de la taille de l'organisme. L'EcoToxXplorer constitue l'autre élément clé du projet EcoToxChip; il s'agit d'un outil d'évaluation des données permettant d'analyser et d'interpréter les résultats de l'analyse EcoToxChip (Soufan *et al.*, 2022). Des analyses EcoToxChips axées sur les espèces ont été mises en place pour les espèces employées dans les modèles de laboratoire et les espèces indigènes, y compris *L. pipiens*; par ailleurs, des méthodes permettant de calculer le point de départ transcriptomique à partir des données des analyses EcoToxChips sont en cours d'élaboration. Dans une étude récente, l'espèce *L. pipiens* au SG 24/25 a été exposée pendant 96 heures à six concentrations de thyroxine, de triiodothyronine et de perchlorate; en outre, on a conservé les tissus des larves entières (v. note de bas de page 101) en vue d'une future analyse EcoToxChip (N. Hogan, Université de la Saskatchewan, communication personnelle, 2022, 2023). Cette technique a été conçue en utilisant des expositions à des stades précoces de développement pour servir d'outil de dépistage à haut rendement et n'a pas été validée pour une utilisation à la fin des options d'essai de 14 ou 42 jours décrites dans cette méthode d'Environnement et Changement climatique Canada. On peut consulter le site Web d'EcoToxChip (www.ecotoxchip.ca) pour de plus amples renseignements.

Les chercheurs peuvent communiquer avec l'Unité d'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement et Changement climatique Canada

pour obtenir des conseils sur d'autres plans d'expérience et d'autres paramètres.

4.7 Validité de l'essai

Pour que l'essai de 14 jours décrit dans ce document de méthode d'essai biologique soit valide, il doit satisfaire à chacun des deux critères suivants^{103,104} :

- i) le taux moyen de survie des têtards maintenus pendant 14 jours dans une eau témoin doit être, à la fin de l'essai, de ≥ 80 %;
- ii) le stade de Gosner moyen pour les têtards maintenus pendant 14 jours dans une eau témoin doit être, à la fin de l'essai, de ≥ 27 .

Pour que l'essai de 42 jours décrit dans ce document de méthode d'essai biologique soit valide, il doit satisfaire à chacun des deux critères suivants^{96,97} :

- i) le taux moyen de survie des têtards maintenus pendant 42 jours dans une eau témoin doit être, à la fin de l'essai, de ≥ 80 %;
- ii) le stade de Gosner moyen pour les têtards maintenus pendant 42 jours dans une eau témoin doit être, à la fin de l'essai, de ≥ 33 .

¹⁰³ Les critères de validité des essais présentés ici sont fondés sur des données témoins obtenues dans plusieurs études réalisées pendant la mise au point de la méthode (LEEAA, 2016a, 2016b; Nautilus Environmental, 2016), sur des valeurs compilées à partir de la documentation (S. Melvin, Université du Queensland [Australie], communication personnelle, 2013; S. Robinson, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa [Ontario], communication personnelle, 2021), et sur trois séries d'une étude interlaboratoire réalisée avec cette méthode (capacité moyenne de survie 80-100 %; Nautilus Environmental 2020a, 2020b).

¹⁰⁴ D'autres méthodes normalisées pour les amphibiens comprennent des considérations s'appliquant aux scénarios dans lesquels les critères de validité ne sont pas satisfaits pendant l'essai (ASTM, 2022a; USEPA, 2015). Dans ces scénarios, l'essai peut tout de même fournir de précieux renseignements. Si un essai effectué selon la méthode décrite dans le présent document ne répond pas aux critères de validité, il est possible de communiquer avec l'UEAM pour obtenir des conseils supplémentaires et une interprétation des résultats.

4.8 Essais employant un toxique de référence

On emploie régulièrement un ou des toxiques de référence pour évaluer, dans des conditions d'essai normalisées, la sensibilité relative d'une partie de la population ou du lot d'organismes dans un élevage particulier (v. § 2.3.1) d'où on choisira les organismes dont on se servira dans un ou plusieurs essais définitifs. Les essais avec un toxique de référence servent également à démontrer la précision et la fiabilité des données obtenues par le laboratoire pour le toxique en question, dans des conditions expérimentales normalisées, ainsi que la compétence technique du personnel du laboratoire qui effectue l'essai (EC, 1990).

On doit évaluer la sensibilité des larves aux toxiques de référence au moment où chaque essai définitif de 14 ou 42 jours est effectué, en utilisant une partie du même lot d'organismes que celui utilisé pour commencer l'essai (EC, 1998, 2011). La variabilité biologique d'un lot à l'autre peut être élevée, même à partir du même événement de reproduction; par conséquent, une partie de chaque lot d'organismes d'essai (c.-à-d. la ou les masses d'œufs) utilisée dans les essais définitifs doit être évaluée à l'aide d'un essai de toxicité de référence¹⁰⁵. L'essai de toxicité de référence doit être réalisé dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour les échantillons d'essai, sauf indication contraire dans les § 4.8.1 à 4.8.3. Le stade de développement initial utilisé pour l'essai de toxicité de référence doit correspondre à celui utilisé pour l'essai définitif correspondant (c.-à-d. le stade 25 de Gosner pour l'essai définitif de 14 jours et le stade 28/29 de Gosner pour l'essai définitif de 42 jours). On peut réaliser les essais de toxicité de référence et les essais définitifs à des jours différents si on ne dispose pas d'un nombre suffisant d'organismes d'essai du même lot pour être utilisé le même jour¹⁰⁶. Il faut effectuer un essai avec un toxique de

¹⁰⁵ Des différences de performance ont été observées entre les différentes masses d'œufs au cours de l'élaboration de la méthode d'essai et des études interlaboratoires. Il s'agit notamment de différences observées dans le taux de fécondation des œufs ainsi que dans le taux de développement des têtards, leur taille (Nautilus Environmental, 2020b) et leur poids (Nautilus Environmental, 2020a).

¹⁰⁶ Dans la pratique, il peut s'écouler quatre à cinq jours

référence conformément aux conditions et aux modes opératoires décrits ici, sous l'un des deux régimes suivants pour l'essai définitif de 14 jours :

- i) un essai de toxicité sublétales de référence à concentrations multiples d'une durée de 14 jours avec des *L. pipiens* provenant des élevages destinés à l'essai définitif (v. § 2.3.1)¹⁰⁷; ou un essai de létalité aiguë à concentrations multiples d'une durée de 96 heures en conditions *statiques* (v. § 4.8.3) avec des *L. pipiens* provenant des élevages destinés à l'essai définitif (v. § 2.3.1), en supposant qu'une justification suffisante soit fournie pour cette option d'essai de courte durée¹⁰⁸;
- ii) l'utilisation d'une concentration témoin positive en même temps que chaque essai définitif;

avant qu'un nombre suffisant d'organismes d'essai du stade de développement requis soit disponible dans le même lot (L. Van der Vliet, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa [Ontario], communication personnelle, 2021). Par ailleurs, on peut conserver une partie de la masse d'œufs fécondés à utiliser pour l'essai définitif à une température plus basse (de 10 à 15 °C) pendant cinq semaines au maximum pour retarder le développement et permettre un essai ultérieur (v. § 2.3.4 et la note de bas de page 12). Pour ces raisons, la flexibilité de ± 14 jours que les méthodes d'essai d'Environnement et Changement climatique Canada offrent généralement pour réaliser un essai de toxicité de référence avant et après l'essai définitif ne peut s'appliquer à cette méthode d'essai.

¹⁰⁷ En règle générale, Environnement et Changement climatique Canada préconise des essais toxicologiques de référence à concentrations multiples mensuels (EC, 1990b); cependant, en raison du manque de disponibilité des organismes d'essai tout au long de l'année, et dans le but de réduire le nombre de têtards utilisés pour les essais, ce n'est pas le cas pour cette méthode d'essai.

¹⁰⁸ Bien que l'essai de létalité de 96 heures soit considéré comme un essai de toxicité de référence acceptable pour l'essai définitif de 14 jours, il est destiné à être utilisé lorsque le laboratoire n'a pas la capacité (c.-à-d. les ressources, un nombre suffisant d'organismes d'essai) d'effectuer les autres essais de toxicité de référence plus intensifs. Un essai de létalité aiguë n'est pas l'option privilégiée pour les essais de toxicité de référence, car il ne permet pas de confirmer si les effets nocifs sur le paramètre sublétales concerné (c.-à-d. la croissance) se situent dans la fourchette attendue.

et effectuer sous l'un des deux régimes suivants pour l'essai définitif de 42 jours :

- i) un essai de toxicité sublétales de référence à concentrations multiples d'une durée de 42 jours avec des *L. pipiens* provenant des élevages destinés à l'essai définitif (v. § 2.3.1);
- ii) l'utilisation d'une concentration témoin positive en même temps que chaque essai définitif.

Si un laboratoire effectue à la fois des essais définitifs sur 14 et 42 jours en utilisant le même lot d'organismes, il est alors acceptable de n'effectuer qu'une seule des options d'essai de toxicité de référence disponibles pour l'essai de 42 jours, au lieu d'effectuer une option pour chaque type d'essai définitif. Par ailleurs, à condition qu'il y ait une justification adéquate, un essai à concentrations multiples de 96 heures peut être accepté comme essai avec un toxique de référence (v. note de bas de page 108).

On devrait choisir une série de concentrations d'essai pour calculer les paramètres appropriés (c.-à-d. la croissance et/ou la mortalité pour l'essai de 14 jours, et le développement pour l'essai de 42 jours). Les concentrations d'essai utilisées devraient être basées sur les données fournies dans le présent document ainsi que sur les courbes concentration-réponse résultant des essais préliminaires effectués par le laboratoire lui-même (v. § 3.3.1). Ces essais définitifs préliminaires à concentrations multiples emploient un toxique de référence avec le système d'essai et les organismes d'essai du laboratoire afin de démontrer sa compétence dans la réalisation de l'essai, de déterminer si le système d'essai du laboratoire convient aux méthodes décrites dans le présent document, et d'établir les concentrations de toxique de référence à utiliser pour chaque essai définitif (v. § 3.3 et 3.5). Les modes opératoires et conditions à appliquer à ces essais préliminaires devraient être conformes à ceux décrits au § 4 du présent document. Toutes les données relatives aux effets (c.-à-d. les réponses moyennes ou médianes à chaque concentration d'essai) devraient être comparées aux valeurs obtenues dans le passé par le même laboratoire et aux résultats publiés dans le présent document établis par Environnement et Changement climatique Canada pour les mêmes substances toxiques de référence.

Les critères convenant à la sélection du toxique de référence à utiliser conjointement avec un essai de toxicité définitif utilisant *L. pipiens* sont notamment les suivants (EC, 1990, 2011) :

- facilité d'obtention de la substance à l'état pur;
- stabilité ou longue conservabilité à l'étalage;
- solubilité élevée dans l'eau;
- stabilité en solution aqueuse;
- danger minime pour l'utilisateur;
- bonne courbe concentration-réponse pour l'organisme d'essai;
- influence connue du pH sur la toxicité de la substance chimique pour l'organisme d'essai;
- influence connue de la dureté de l'eau sur la toxicité de la substance chimique pour l'organisme d'essai;
- dosage précis facile.

On devrait préparer chaque concentration d'essai conformément aux conseils des § 4.1 et 5.2. On devrait doser, par les méthodes chimiques appropriées, le toxique de référence (y compris les concentrations uniques utilisées comme témoin positif) dans toutes les solutions mères (APHA *et al.*, 2017) (p. ex. spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif pour le sodium, chromatographie par échange d'ions pour le chlorure, ou conductivité comme substitut du chlorure de sodium si on la compare à des données historiques; CL-SM pour la thyroxine). Après préparation des concentrations d'essai du toxique de référence, on devrait prélever, au moins, des aliquotes du témoin ainsi que des concentrations minimale, médiane et maximale, ou de la concentration unique utilisée en tant que témoin positif¹⁰⁹. Chaque aliquote devrait être soit analysée directement, soit entreposée pour analyse ultérieure (c.-à-d. à la fin de l'essai) si le ou les paramètres de l'essai de toxicité de référence ou la réponse du témoin positif fondé sur les concentrations nominales se trouvait à l'extérieur de la *limite*

¹⁰⁹ Si les paramètres statistiques de chaque essai de toxicité de référence doivent se fonder sur des concentrations mesurées, il est recommandé de prélever et d'analyser au moins une aliquote de chaque concentration à l'étude. Toutefois, si les paramètres statistiques de chaque essai se fondent sur des concentrations nominales, il est alors recommandé de prélever et d'analyser des aliquotes des concentrations minimales, médianes et maximales.

d'avertissement. Si l'on conserve des aliquotes de l'échantillon, ce doit être à l'obscurité, à 4 ± 2 °C. Les aliquotes entreposées qui doivent faire l'objet de dosages devraient être analysées promptement, dès la fin de la réalisation de l'essai avec un toxique de référence. On devrait calculer les paramètres statistiques de l'essai de toxicité de référence à concentrations multiples ou du témoin positif à partir des concentrations mesurées, si elles sont sensiblement différentes (c.-à-d. d'au moins 20 %) des concentrations nominales et si l'exactitude des analyses chimiques est satisfaisante.

Le tableau 6 propose un résumé des conditions d'essai et des critères de validité pour chaque option d'essai de toxicité de référence, aussi décrits en détail dans les § 4.8.1 à 4.8.3.

On peut utiliser les essais de toxicité de référence et les témoins positifs pour surveiller la cohérence dans le temps (moyennes similaires entre les essais) ainsi que la précision dans le temps (chevauchement des gammes entre les essais de témoins positifs). Les valeurs aberrantes dans les réponses des organismes d'essai ou la variabilité extrême dans les réponses obtenues lors des essais individuels doivent servir de base pour déclencher des recherches sur les causes potentielles, comme la sensibilité des élevages, la santé des élevages, les conditions du milieu ou de l'installation ainsi que la performance des techniciens. Les données obtenues des témoins négatifs, des essais de toxicité de référence à concentrations multiples ou des témoins positifs, tout comme les données sur la santé des élevages, devraient être surveillées dans le temps (par une analyse des tendances) afin de déterminer de manière proactive les changements observés dans la réponse des organismes.

4.8.1 Essais sublétaux à concentrations multiples avec un toxique de référence

La présente sous-section traite des conditions et modes opératoires applicables aux essais de toxicité sublétaux de référence à concentrations multiples exécutés parallèlement à un essai de toxicité avec *L. pipiens*, de même qu'aux essais visant à déterminer si les lots d'organismes d'essai qu'on prévoit utiliser dans des essais de toxicité d'un sol sont acceptables et appropriés. Ces conditions et modes opératoires devraient, par ailleurs, être utilisés pour évaluer la précision intralaboratoire lorsqu'un laboratoire s'apprête pour la première fois

Tableau 6 Liste de contrôle des conditions et des modes opératoires recommandés et exigés pour les essais de toxicité de référence sur des grenouilles selon leurs stades de développement aquatiques

Essai définitif	14 jours			42 jours	
Option d'essai de toxicité de référence	i) Essai de toxicité sublétales à concentrations multiples	ii) Témoin positif	iii) Essai de létalité aiguë à concentrations multiples	i) Essai de toxicité sublétales à concentrations multiples	ii) Témoin positif
Organismes*	<i>Lithobates pipiens</i> , SG 25; ≥10 organismes par récipient d'essai			<i>Lithobates pipiens</i> , SG 28/29; ≥10 organismes par récipient d'essai	
Répétitions par variante expérimentale	≥3	≥3	1	≥4 pour les concentrations d'essai; ≥8 pour les témoins	≥ 4
Concentrations	≥ 7 ou ≥ 5**	1	≥ 7 ou ≥ 5**	≥ 7 ou ≥ 5**	1
Substance chimique recommandée	NaCl	S.O.	NaCl	S.O.	T4
Durée de l'exposition	14 jours	14 jours	96 heures	42 jours	42 jours; 14 jours en cas d'utilisation de la T4***
Paramètres	survie; croissance (longueur totale, poids humide, biomasse)	survie; croissance (longueur totale, poids humide, biomasse)	(survie)	survie; croissance (longueur totale, poids humide, biomasse); développement (stade de Gosner)	survie; croissance (longueur totale, poids humide, biomasse); développement (stade de Gosner)
Exigences concernant les témoins négatifs ou du solvant à la fin de l'essai pour un essai valide	survie moyenne ≥ 80 %; développement moyen SG ≥ 27	survie moyenne ≥ 80 %; développement moyen SG ≥ 27	survie moyenne ≥ 90 %	survie moyenne ≥ 80 %; développement moyen SG ≥ 33	survie moyenne ≥ 80 %; SG ≥ stade de développement moyen défini par le laboratoire en fonction de la durée
Exigences concernant le témoin positif	S.O.	l'ampleur cible avec effet est prédéfinie par le laboratoire; le changement dans la croissance se situe dans les limites d'acceptabilité (v. annexe H dans ECCC, 2022 par exemple)	S.O.	S.O.	l'ampleur cible avec effet (p. ex. augmentation de 4 SG) est prédéfinie par le laboratoire; différence importante dans le développement par rapport au témoin négatif ou au témoin du solvant

Carte de contrôle	croissance (CIP pour la longueur totale, le poids humide ou la biomasse)	croissance (CIP pour la longueur totale, le poids humide ou la biomasse)	survie (CL50)	développement (CMEO pour le changement moyen dans le développement [stade de Gosner] par rapport au témoin négatif ou du solvant); en plus d'une carte de contrôle, il est possible de surveiller la cohérence de la relation dose-réponse dans le temps	développement (changement moyen dans le développement [stade de Gosner] par rapport au témoin négatif ou au témoin du solvant)
--------------------------	--	--	---------------	--	--

Les renseignements contenus dans ce tableau ne sont qu'un résumé. Les exigences et recommandations définitives de cette méthode d'essai figurent dans le corps du présent document.

* Le même lot d'organismes d'essai que celui utilisé pour l'essai définitif doit être utilisé pour l'essai avec le toxique de référence.

** On peut utiliser moins de concentrations d'essai (≥ 5) si le laboratoire dispose d'éléments démontrant qu'une série de concentrations réduite peut saisir de manière fiable les effets recherchés.

*** Si l'on utilise un toxique de référence autre que la T4 qui stimule le développement de la même manière, le laboratoire devrait rechercher une durée d'exposition appropriée pour le témoin positif.

à appliquer les présentes méthodes d'essai biologique (v. § 2.3.1, 2.3.9 et 3.3.1).

Les essais de toxicité de référence sublétale à concentrations multiples doivent être réalisés avec des organismes provenant du même lot que celui utilisé pour l'essai définitif et peuvent être réalisés simultanément à un essai de toxicité définitif si les ressources et le nombre d'organismes disponibles au stade de développement requis le permettent (v. § 2.3.4 et note de bas de page 12).

On recommande d'utiliser le chlorure de sodium (NaCl) pour l'option d'essai de toxicité de référence sublétale à concentrations multiples réalisé parallèlement à l'option d'essai définitif de 14 jours décrite dans le présent document¹¹⁰. La thyroxine (T4) pourrait être utilisée dans un format à concentrations multiples parallèlement à un essai de 42 jours, puisqu'on l'utilise avec succès dans l'étude interlaboratoire avec une durée d'essai de

¹¹⁰ La CL50 moyenne sur 14 jours (\pm écart-type) du NaCl pour *L. pipiens* était de $4,2 \pm 0,7$ g/L au cours de la première série de l'essai interlaboratoire. Les concentrations utilisées étaient de 0; 0,80; 1,2; 1,8; 2,7; 4,0 et 6,0 g/L. La CI50 moyenne sur 14 jours (\pm écart-type) pour la biomasse (basée sur le poids humide) découlant de cette étude était de $3,5 \pm 0,9$ g/L, et la CI50 pour la longueur n'a pas pu être calculée, mais elle était probablement proche de 4,0 g/L d'après les observations faites dans deux des quatre laboratoires (Nautilus Environmental, 2020a).

14 jours¹¹¹. Toutefois, au moment de la publication, Environnement et Changement climatique Canada n'avait pas encore entièrement défini les critères permettant d'évaluer les résultats d'un plan d'expérience à concentrations multiples. Le § 4.8.2 fournit des indications sur l'utilisation de la T4 dans un plan d'expérience à concentration unique.

L'essai de toxicité sublétale de référence doit être réalisé sous la forme d'un essai définitif en conditions statiques ou d'un essai à concentrations multiples à renouvellement continu, en appliquant des paramètres de survie et de croissance pour un essai de 14 jours ou des paramètres de survie, de croissance et de développement pour un essai de 42 jours. Les conditions et modes opératoires décrits

¹¹¹ Environnement et Changement climatique Canada a acquis une certaine expérience dans l'utilisation de la T4 comme toxique de référence au cours de l'étude interlaboratoire. Au cours de la première série d'essais, des expositions de 14 jours à la T4 ont produit une relation dose-réponse indiquant des progrès croissants dans le développement avec l'augmentation de la concentration de T4 dans tous les laboratoires participants. Les concentrations utilisées étaient de 0; 0,074; 0,22; 0,67; 2,0 et 6,0 μ g/L. Des effets significatifs touchant le développement par rapport au témoin ont été observés à des concentrations $\geq 0,67$ μ g/L dans tous les laboratoires, ainsi qu'à des concentrations plus faibles dans deux laboratoires. La CI50 moyenne sur 14 jours (\pm écart-type) pour le poids humide découlant de cette étude était de $1,5 \pm 0,1$ g/L, et la CI50 pour la longueur n'a pas pu être calculée (Nautilus Environmental, 2020a).

dans la présente sous-section pour réaliser un essai définitif de 14 ou 42 jours doivent s'appliquer à chacun de ces essais de toxicité de référence. Les conditions et modes opératoires supplémentaires décrits au § 4 pour un essai à concentrations multiples sur des échantillons d'eau s'appliquent à chaque essai de toxicité de référence. Les modes opératoires décrits au § 5 pour la préparation et la mise à l'essai des substances et produits chimiques s'appliquent également ici.

Si cette option est retenue, l'essai de toxicité sublétale de référence à concentrations multiples doit être effectué en utilisant les mêmes récipients d'essai que ceux utilisés pour les essais définitifs (v. § 3.3.2), avec le même volume de solution d'essai. Il faut utiliser au moins ≥ 7 concentrations plus le ou les témoins; toutefois, on peut utiliser moins de concentrations d'essai (≥ 5) si le laboratoire dispose d'éléments démontrant qu'une série de concentrations réduite peut saisir de manière fiable les effets recherchés. Pour les essais de toxicité de référence menés conjointement avec l'essai de 14 jours, le nombre de récipients d'essai (répétitions) par concentration avec le toxique de référence et par témoin doit être ≥ 3 . Pour les essais de toxicité de référence réalisés conjointement avec l'essai de 42 jours, le nombre de récipients d'essai (répétitions) par concentration avec le toxique de référence doit être ≥ 4 et le nombre de répétitions pour le témoin doit être ≥ 8 . Le nombre de têtards par récipient d'essai doit être ≥ 10 , conformément au § 4.2.

Les modes opératoires du début et de la fin d'un essai de toxicité de référence à concentrations multiples doivent correspondre à ceux qui sont décrits dans les § 4.2 et 4.5. Les conditions expérimentales décrites dans le § 4.3 doivent s'appliquer. Les organismes d'essai doivent être nourris conformément à la description au § 4.3.6. On doit appliquer les observations et les mesures décrites dans le § 4.4.

Les critères de validité des essais de toxicité de référence sont les mêmes que ceux décrits pour les essais définitifs de la même durée (v. § 4.7 et tableau 6). On doit calculer les paramètres selon les indications du § 4.6.2, des paramètres qu'il faudrait exprimer en milligrammes ou grammes de la substance chimique de référence par litre de solution d'essai.

4.8.2 Témoin positif

La Section de l'évaluation biologique et normalisation d'Environnement et Changement climatique Canada introduit l'utilisation de répétitions témoins positives, dans le cadre de chaque essai définitif, en remplacement des essais sur des toxiques de référence à concentrations multiples. Dans le cas du toxique de référence pour le témoin positif, il faut utiliser une seule concentration d'un toxique connu, qui suscite une réponse partielle constante (par rapport aux essais de toxicité de référence traditionnels réalisés avec des concentrations multiples pour saisir une gamme d'effets, allant d'effet sur la croissance ou le développement à l'absence d'effet sur la croissance ou le développement). Cette approche présente un avantage biologique, puisque les paramètres mesurés sont les mêmes que dans l'essai définitif, ainsi qu'un avantage économique et éthique, puisque l'utilisation de répétitions du témoin positif permet de réduire les efforts, les ressources et le nombre d'organismes nécessaires. L'utilisation de témoins positifs consiste à exposer les organismes d'essai à des conditions comparables à celles d'un témoin négatif (même nombre de répétitions, même nombre d'organismes par répétition, mêmes récipients et conditions d'essai, etc.), mais ils sont exposés à une concentration unique d'un toxique connu (v. § 3.5). Cette option pourrait être plus réalisable et plus pratique dans le cas des essais de toxicité à long terme de type « sublétal » et sur le « cycle de vie », notamment l'essai définitif de 42 jours mené sur *L. pipiens*, décrit dans la présente méthode d'essai.

Pour l'option d'essai de 14 jours, Environnement et Changement climatique Canada n'a pas pu recommander de toxique de référence à concentration unique au moment de la publication de cette méthode¹¹²; cependant, un laboratoire peut

¹¹² Le chlorure de sodium (NaCl) s'est avéré être un toxique de référence très efficace pour les essais de toxicité de référence à concentrations multiples; cependant, aucune concentration unique n'a donné de réponse partielle reproductible pour la croissance (Nautilus Environmental, 2020a). De même, les effets d'une concentration unique de thyroxine (T4) sur la croissance n'étaient pas reproductibles dans les essais interlaboratoires (Nautilus 2020b; L. Van der Vliet, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa [Ontario], communication personnelle, 2021). Par conséquent, Environnement et Changement climatique Canada n'est pas en mesure de recommander l'utilisation

choisir d'étudier un toxique de référence approprié et une concentration d'essai à utiliser comme témoin positif. L'annexe H d'ECCC (2022) décrit un exemple pratique de choix d'une concentration unique d'un toxique de référence pour l'évaluation des effets quantitatifs, et peut être consultée à titre d'orientation.

L'utilisation de la thyroxine (T4) est recommandée dans le présent document en tant que témoin positif à concentration unique parallèlement à l'essai définitif de 42 jours. L'exposition à la T4 accélère le développement des têtards, dont la réaction est constante dans le temps après seulement 14 jours d'exposition¹¹³. Si on choisit la T4 comme toxique de référence à utiliser parallèlement à l'essai définitif de 42 jours, le témoin positif et le *témoin du solvant* ne doivent être utilisés que pendant 14 jours, car une durée plus longue conduirait probablement la plupart des têtards à atteindre le stade 42 de Gosner avant la fin de l'essai définitif de 42 jours. Si on utilise un autre toxique de référence qui stimule le développement de la même manière, le laboratoire devrait rechercher une durée d'exposition appropriée. Les modes opératoires décrits au § 5 pour la préparation et la mise à l'essai des substances et produits chimiques s'appliquent également ici.

Les répétitions témoins positives doivent être préparées en utilisant les mêmes récipients d'essai que ceux utilisés pour les essais définitifs (v.

du NaCl ou de la T4 comme témoin positif parallèlement à l'essai définitif de 14 jours.

¹¹³ Au cours de trois séries de l'étude interlaboratoire menées par Environnement et Changement climatique Canada, les têtards d'un laboratoire ont réagi de manière cohérente à une exposition de 14 jours à 0,67 µg/L de T4, avec un développement accéléré de 4,6 à 5,0 stades de Gosner par rapport aux témoins du solvant (3 mg/L de NaOH) (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b). Dans quatre essais réalisés dans trois autres laboratoires, les têtards ont réagi à ce régime d'exposition par un développement accéléré de 3,0 à 10,8 stades de Gosner par rapport aux témoins de l'eau de dilution (Nautilus Environmental, 2020a). Ces données indiquent qu'une concentration unique de T4 peut induire de manière fiable une augmentation du développement des têtards et qu'elle peut donc être utilisée comme témoin positif au cours d'un essai axé sur les perturbations endocriniennes et les paramètres de développement.

§ 3.3.2), avec le même volume de solution d'essai (c.-à-d. ≥ 7 L). Le nombre de récipients d'essai (répétitions) par concentration témoin positive doit être ≥ 3 lorsqu'ils sont utilisés parallèlement à l'essai définitif de 14 jours; le nombre de récipients d'essai (répétitions) par concentration témoin positive doit être ≥ 4 lorsqu'ils sont utilisés parallèlement à l'essai définitif de 42 jours. Le nombre de têtards par récipient d'essai doit être ≥ 10 , conformément au § 4.2. La concentration témoin positive devrait être préparée conformément aux directives en 4.1 et 5.2, et les modes opératoires et conditions d'essai doivent être conformes à ceux utilisés dans l'essai définitif, tel qu'il est décrit aux § 4.2 et 4.5.

Dans le cas des témoins positifs utilisés parallèlement à l'essai définitif de 14 jours, le paramètre requis est la croissance moyenne corrigée (c.-à-d. mesurée en tant que longueur totale individuelle, poids humide ou biomasse) dans la concentration témoin positive, soustraite de la moyenne dans le témoin négatif, divisée par la réponse moyenne du témoin négatif et multipliée par 100 pour obtenir un pourcentage de changement. Dans le cas des témoins positifs utilisés parallèlement à l'essai définitif de 42 jours, le paramètre requis est le stade de développement moyen (c.-à-d. le stade de Gosner) pour la concentration témoin positive, soustraite de la moyenne du témoin négatif, afin d'obtenir le taux de changement dans le stade de développement (dans le cas de la thyroxine, il s'agit d'un développement accéléré).

Si cette méthode est retenue, la réponse des témoins positifs (c.-à-d. ampleur cible avec effet) doit être définie et doit inclure les limites d'acceptabilité pour chaque paramètre. Les limites d'acceptabilité aux fins de la présente méthode sont synonymes de *limites d'avertissement* et elles doivent être définies de façon opérationnelle dans chaque laboratoire en prévoyant des limites de variabilité adaptées à l'objectif. Les méthodes d'essai d'Environnement et Changement climatique Canada fournissent généralement des indications sur la manière de calculer les limites d'avertissement pour les témoins positifs; toutefois, les données relatives au stade de développement ne sont pas distribuées normalement, les mesures habituelles (p. ex. coefficient de variation, écart-type) ne conviennent donc pas ici. Les laboratoires pourraient s'attendre à ce que les résultats des témoins positifs pour la T4 se situent

dans les fourchettes observées lors des essais interlaboratoires (v. note de bas de page 111 du § 4.8.1). Il est possible de communiquer avec l'UEAM pour obtenir des conseils supplémentaires sur le calcul des limites d'acceptabilité pour les données relatives aux stades de développement.

4.8.3 Essai de létalité aiguë à concentrations multiples avec un toxique de référence

Dans certaines conditions, une autre solution est prévue pour les essais avec un toxique de référence pour l'essai définitif de 14 jours (v. note de bas de page 108). Pour cette option, un essai de toxicité létale aiguë de référence à concentrations multiples sur 96 heures doit être réalisé, en utilisant la capacité de survie comme paramètre. Les essais de toxicité létale aiguë de référence à concentrations multiples doivent être réalisés avec des organismes provenant du même lot que ceux utilisés pour l'essai définitif et ils peuvent être réalisés en même temps qu'un essai de toxicité définitif si les ressources et le nombre d'organismes disponibles au stade de développement requis le permettent. On recommande le chlorure de sodium (NaCl) comme toxique de référence pour cet essai de 96 heures¹¹⁴.

Si cette option est retenue, les conditions d'essai et les modes opératoires décrits dans le présent document doivent être appliqués. Ces modes opératoires se fondent sur les procédures normalisées d'exploitation élaborées par le LEEA (P. Jackman, Environnement et Changement climatique Canada, Moncton [Nouveau-Brunswick], communication personnelle, 2021). L'essai de

¹¹⁴ Le LEEA (2006) a utilisé avec succès des concentrations d'essai de 0; 1 000; 1 800; 3 200; 5 600 et 10 000 mg/L de NaCl dans des essais de toxicité létale aiguë de référence sur 96 heures employant des larves de *L. pipiens*. La CL50 moyenne de NaCl sur 96 heures pour *L. pipiens* établie au LEEA avec cette série de concentrations était de 5 120 mg/L ($n = 12$ essais; P. Jackman, Environnement et Changement climatique Canada, Moncton [Nouveau-Brunswick], communication personnelle, 2022). Lors de la première série de l'essai interlaboratoire, deux laboratoires ont observé une mortalité nulle ou quasi nulle à la plus forte concentration de NaCl testée (6,0 g/L) après 96 heures, mais deux laboratoires ont observé une mortalité conforme aux résultats du LEEA (c.-à-d. une mortalité moyenne de 13 % à 27 % à 4,0 g/L de NaCl, et de 87 % à 100 % à 6,0 g/L de NaCl [Nautilus Environmental, 2020a]), avec des CL50 à 96 heures de 4,3 et 4,9 g/L de NaCl.

toxicité de référence à concentrations multiples doit être effectué en utilisant les mêmes récipients d'essai que ceux utilisés pour les essais définitifs (v. § 3.3.2), avec le même volume de solution d'essai. Les essais sont réalisés en conditions statiques sans renouvellement. Il faut utiliser au moins ≥ 7 concentrations plus le ou les témoins; toutefois, on peut utiliser moins de concentrations d'essai (≥ 5) si le laboratoire dispose d'éléments démontrant qu'une série de concentrations réduite peut saisir de manière fiable les effets recherchés. Les modes opératoires décrits au § 5 pour la préparation et la mise à l'essai des substances et produits chimiques et des mélanges chimiques s'appliquent également ici. Il faut inclure au moins une répétition par variante expérimentale, y compris le ou les témoins, dans l'essai. Le nombre de têtards par récipient d'essai doit être ≥ 10 , conformément au § 4.2. Les têtards de *Lithobates pipiens* au stade 25 de Gosner et provenant du même lot que ceux utilisés pour l'essai définitif de 14 jours doivent être utilisés pour commencer l'essai par le toxique de référence. Les organismes d'essai sont nourris au début de l'essai (p. ex. 0,2 g de chou fourrager et 0,05 g de nourriture séchée pour têtards par récipient d'essai, en supposant 10 têtards par répétition, fournis à $t = 0$; v. le tableau 5 au § 4.3.6), mais ne sont pas nourris pendant le reste de l'essai. Il faut suivre les exigences en matière de température et d'éclairage décrites au § 4.3.3. On doit appliquer les observations et les mesures décrites au § 4.4. Les modes opératoires de la fin d'un essai de toxicité de référence doivent correspondre à ceux qui sont décrits au § 4.5. On doit mettre fin à l'essai après 96 heures et consigner le nombre d'organismes survivants dans chaque variante expérimentale. On doit calculer la CL50 après 96 heures (v. § 4.6.2.1). On peut également mesurer les paramètres de croissance tels que la longueur totale moyenne corrigée, le poids humide moyen corrigé et la biomasse moyenne corrigée dans chaque variante expérimentale à la fin de l'essai (v. § 4.6.1). Les résultats d'un essai de toxicité de référence devraient être exprimés en milligrammes ou grammes de substance chimique de référence par litre de solution d'essai. L'essai est valide si la survie est ≥ 90 % chez les témoins.

4.8.4 Carte de contrôle

Pour les essais de toxicité de référence à concentrations multiples et les témoins positifs, lorsque suffisamment de données ont été recueillies

(p. ex. au moins cinq points de données) (EC, 1990, 2005), on doit porter successivement sur une *carte de contrôle* tous les paramètres comparables (c.-à-d. les CI50, les CIp ou la CME0 pour le changement moyen dans le développement [stade de Gosner] par rapport au témoin pour un toxique de référence particulier calculées à partir des essais de toxicité de référence à concentrations multiples; le pourcentage de changement dans les paramètres de croissance ou le changement dans le stade de développement par rapport au témoin pour une concentration unique du toxique de référence mis à l'essai en tant que témoin positif). Pour les essais de toxicité de référence à concentrations multiples, la carte de contrôle devrait porter sur son axe vertical le logarithme de la concentration en fonction de la date ou du numéro de l'essai sur l'axe horizontal. Dans le cas des concentrations témoins positives, sur chacune des cartes de contrôle, il faudrait porter le changement dans la réponse (pourcentage de changement dans la croissance ou le changement moyen dans le stade de développement) par rapport au témoin de l'eau de solution ou du solvant sur l'axe vertical, et la date ou le numéro de l'essai, sur l'axe horizontal (Environnement et Changement climatique Canada, 2020, 2022). On devrait examiner chaque nouveau point de données pour le toxique de référence afin de déterminer s'il se situe à plus ou moins deux écarts-types (± 2 ET) des valeurs obtenues dans des essais antérieurs comparables avec le même toxique de référence et le même mode opératoire (ECCC, 2020, 2022). Il faut préparer une carte de contrôle séparée et l'actualiser pour chaque mode opératoire différent (p. ex. différentes durées d'essai, différents toxiques de référence) et effet mesuré. Pour les essais de toxicité de référence ou les témoins positifs réalisés parallèlement à l'essai de 14 jours, il faut préparer une carte de contrôle en utilisant au moins l'un des paramètres de croissance (longueur totale, poids humide ou biomasse) corrigé en fonction des mesures initiales. Pour les essais de toxicité de référence ou les témoins positifs réalisés parallèlement à l'essai de 42 jours, il faut préparer une carte de contrôle en utilisant le paramètre de développement (stade de Gosner). On devrait comparer chaque nouveau point de données du toxique de référence aux limites établies du graphique : le résultat du toxique de référence est acceptable s'il se situe dans les limites d'avertissement. Les modes opératoires typiques servant à établir les limites d'avertissement pour d'autres plans d'expérience (p. ex. ± 2 ET) peuvent

ne pas convenir dans cette situation. On peut établir des limites d'avertissement raisonnables en fonction de l'avis d'experts.

Dans le cas des essais de toxicité de référence à concentrations multiples, le logarithme de la concentration doit servir au calcul de la moyenne et de l'écart-type ainsi qu'à l'établissement de tous les graphiques. De la sorte, on continue de se conformer à l'hypothèse selon laquelle chaque CL50 ou CIp a été estimée à partir de logarithmes de concentrations. On peut établir la carte de contrôle en portant la moyenne et la valeur ± 2 ET en tant que logarithme, ou en les convertissant en valeurs arithmétiques, puis en les portant sur l'échelle logarithmique de concentration. Différentes approches pour établir une carte de contrôle (p. ex. Levey-Jennings, moyenne mobile) sont acceptables. Pour l'essai de toxicité de référence à concentrations multiples de 42 jours, outre la carte de contrôle, on peut surveiller la cohérence de la relation dose-réponse pour le paramètre du développement au fil du temps. Dans le cas des concentrations témoins positives, on peut établir la carte de contrôle en reportant la moyenne et la valeur ± 2 ET liée au pourcentage de changement dans la croissance. Il est possible de communiquer avec l'UEAM pour obtenir des conseils sur l'établissement de cartes de contrôle pour le paramètre du développement, car la distribution des données relatives au stade de développement n'est pas normale, de sorte que les mesures habituelles (p. ex. ET) ne conviennent pas.

On devrait recalculer la moyenne des valeurs des effets mesurés connus, ainsi que les limites supérieure et inférieure d'avertissement (± 2 ET) à chaque nouveau résultat que l'on obtient pour le toxique de référence jusqu'à ce que la statistique se stabilise (ECCC, 2020, 2022). Les cartes de contrôle peuvent servir à dégager des tendances au fil du temps. Des exemples de tendances qui pourraient être observées sont notamment les suivantes : une tendance ascendante ou descendante, plusieurs points successifs d'un côté de la moyenne, des changements qui sont observés à différents moments de l'année et des valeurs successives des points de données situées à l'extérieur des limites d'avertissement ± 2 ET. Si un point de donnée particulier tombe à l'extérieur des limites d'avertissement, la sensibilité des organismes d'essai ainsi que l'exécution et la précision de l'essai deviennent suspectes. Comme cela pourrait se

produire 5 % du temps, du seul fait du hasard, un point de donnée aberrant n'est pas nécessairement le signe d'une sensibilité anormale des organismes d'essai ni d'une précision insatisfaisante des données sur la toxicité. Ce serait plutôt un avertissement. On devrait alors effectuer une vérification approfondie de toutes les conditions et de tous les modes opératoires utilisés pour l'élevage et l'essai, ainsi que pour l'efficacité technique. Selon les constatations, on pourrait devoir répéter l'essai de toxicité de référence ou la concentration témoin positive, ou obtenir un nouveau lot d'organismes d'essai avant d'entreprendre d'autres essais de toxicité.

Les résultats qui se situent à l'intérieur des limites d'avertissement ne sont pas nécessairement un signe de constance du laboratoire. Si le laboratoire produisait des résultats historiques extrêmement variables, les limites d'avertissement seraient larges; un nouveau point de donnée simple pourrait se trouver à l'intérieur des limites, tout en représentant une variation indésirable des résultats de l'essai. Environnement Canada (EC, 1990, 2005) a proposé comme limites raisonnables un *coefficient de variation* (CV) ne dépassant pas 30 % et, de préférence, de 20 %, pour la moyenne des valeurs des paramètres disponibles. Pour cette méthode d'essai biologique, le coefficient de variation des moyennes obtenues dans les essais de toxicité de référence à concentrations multiples effectués à l'aide du chlorure de sodium ne devrait pas dépasser 20 % pour le paramètre de survie et de 30 % pour le paramètre de croissance.

Une CL50, une CIp ou un témoin positif qui se situe 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 d'essai se situent entre les limites de contrôle et les limites d'avertissement 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.

4.9 Considérations relatives à la conservation et au bien-être des animaux

Le cadre des 3 R a été élaboré par Russell et Burch (1959) et s'applique à tous les essais sur les animaux vertébrés. Il décrit le « remplacement », pour éviter ou remplacer l'utilisation d'animaux dans les essais de toxicité; la « réduction », pour minimiser le nombre d'animaux utilisés par essai de toxicité; et le « raffinement », pour utiliser des modes opératoires de manipulation et de mise à l'essai des animaux qui minimisent la douleur et la détresse. Environnement et Changement climatique Canada reconnaît et approuve la nécessité d'éviter l'utilisation de vertébrés dans les essais de toxicité, et a donc intégré les 3 R dans cette méthode d'essai au cours de son élaboration (v. § 1.1 et 1.3).

Pour intégrer le « remplacement », l'option d'un essai définitif de létalité aiguë (CL50 après 96 h) pour *L. pipiens* n'a pas été incluse, car les données sur la létalité aiguë des poissons peuvent être utilisées comme substitut (v. § 1.3.1; Martinko et Van der Vliet, 2021; Environnement et Changement climatique Canada, 2023), et il est peu probable que ce paramètre fournisse des renseignements suffisants pour l'évaluation des risques (PASCF, 2019). En outre, on peut se servir des analyses de l'expression génétique telles que l'essai EcoToxChip pour l'évaluation des substances chimiques afin d'estimer le danger potentiel ou en tant que paramètre supplémentaire pour la méthode décrite dans le présent document (v. § 4.6.3.2).

Pour intégrer la « réduction », le nombre de paramètres biologiques pouvant être mesurés dans chaque essai a été maximisé. Par exemple, le poids humide est un paramètre obligatoire, mais le poids sec ne l'est pas. Les organismes d'essai peuvent donc être conservés ou préparés selon les besoins pour d'autres paramètres d'essai tels que l'expression génétique ou l'histologie, afin d'obtenir autant de renseignements pertinents que possible à partir d'une seule exposition d'essai (v. § 4.6.3.2). En outre, il est possible de remplacer les essais à concentrations multiples avec un toxique de référence par un témoin positif à concentration unique (v. § 4.8.2), ce qui peut réduire le nombre d'animaux utilisés de ≥ 210 à ≥ 30 . Le calcul de la puissance en vue d'optimiser le plan d'expérience pour l'option d'essai de 42 jours, en mettant l'accent

sur les paramètres de développement, représente un autre élément à considérer pour la réduction (v. § 4.6.2.4). Cette optimisation a permis de définir le nombre d'organismes nécessaires pour détecter les effets sur le développement avec une puissance suffisante dans l'analyse statistique. Cette approche permet d'éviter de gaspiller des organismes (c.-à-d. d'en utiliser plus que nécessaire ou moins que nécessaire pour détecter un effet). Enfin, les utilisateurs de la méthode sont vivement encouragés à effectuer un essai préliminaire avant de procéder à l'essai définitif. L'essai préliminaire utilise moins de répétitions pour non seulement aider à définir plus précisément les concentrations à utiliser dans un essai définitif, mais aussi pour réduire potentiellement le nombre de concentrations nécessaires pour saisir les paramètres requis (v. § 4.1). Cela permet en fin de compte d'utiliser moins d'organismes dans un essai définitif et de réduire le risque de devoir répéter l'essai.

Pour intégrer le « raffinement », la méthode d'essai a été conçue pour utiliser les premiers stades de développement plus sensibles des amphibiens (c.-à-d. les têtards au lieu des embryons; v. § 1.3.2). Des conseils sont donnés pour obtenir des organismes d'essai sains issus d'une reproduction en laboratoire à stimulation hormonale, afin de minimiser l'impact

sur les populations naturelles (v. § 2.4.3 et l'annexe F). Des conseils pour la manipulation des organismes et pour la mise en quarantaine, le diagnostic et le traitement des grenouilles adultes reproductrices présentant des signes de maladie sont également fournis, afin d'éviter toute euthanasie inutile (annexe E). Pour les laboratoires qui disposent d'élevages d'amphibiens, on recommande de mettre en quarantaine les nouveaux lots d'organismes d'essai afin de prévenir le transfert de maladies entre les organismes (v. § 2.3.9, 2.4.4 et annexe E; CCPA, 2021). On encourage de filtrer les eaux naturelles utilisées dans l'essai (contaminées ou propres) afin d'éliminer les organismes pathogènes potentiels (v. § 3.4). Les laboratoires sont également encouragés à demander conseil aux comités locaux de protection des animaux et/ou aux vétérinaires, si nécessaire, pour préserver la santé des organismes d'essai. Les utilisateurs sont encouragés à consulter les lignes directrices récemment publiées par le CCPA (2021), qui décrivent les considérations relatives au bien-être des animaux pour les amphibiens et recommandent les ressources suivantes pour en savoir plus : Burghardt (2013), Kuppert (2013), Michaels *et al.* (2014), et Morgan et Tromborg (2007). Des références supplémentaires sont fournies à l'annexe E de la présente méthode.

Section 5

Modes opératoires particuliers pour les essais de toxicité sur des produits chimiques

La présente section donne des instructions précises concernant les essais sur des *produits chimiques*, de substances chimiques (p. ex. formulations) ou de mélanges chimiques individuels (c.-à-d. échantillons d'eau modifiés avec une substance d'essai), en plus des modes opératoires décrits au § 4.

5.1 Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons

On devrait obtenir des renseignements sur les propriétés du produit chimique, de la formulation ou du mélange de produits chimiques à expérimenter, notamment ses principaux ingrédients (principes actifs) et leurs concentrations, sa solubilité dans l'eau, sa tension de vapeur, sa stabilité chimique, ses constantes de dissociation, ses coefficients d'adsorption, sa toxicité pour les humains et les organismes aquatiques et sa biodégradabilité. Il faudrait consulter les fiches de données sur les aspects liés à la sécurité des substances d'essai (p. ex. fiches de données de sécurité), s'il en existe. Quand la solubilité dans l'eau soulève des doutes ou des difficultés, les modes opératoires acceptables utilisés antérieurement pour la préparation de solutions aqueuses du produit chimique devraient être recueillis et consignés, et/ou la solubilité du produit chimique dans l'eau témoin/de dilution devrait être déterminée en laboratoire. Il faudrait également recueillir et consigner les autres renseignements existants, par exemple la formule structurelle, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés significatives, la présence et les quantités d'additifs et le coefficient de partage octanol-eau¹¹⁵. On devrait aussi connaître une

méthode analytique acceptable pour mesurer le produit chimique dans l'eau aux concentrations prévues pour l'essai, ainsi que les données indiquant la précision et l'exactitude de l'analyse.

Dès réception des produits chimiques, les contenants doivent être fermés hermétiquement et codés ou étiquetés. L'information requise (c.-à-d. le nom du produit chimique, le fournisseur, la date de réception) doit être indiquée sur l'étiquette et/ou consignée sur une fiche de données distincte consacrée à l'échantillon, le cas échéant. Les conditions d'entreposage (p. ex. température, protection contre la lumière) sont souvent commandées par la nature du produit chimique. Les modes opératoires normalisés pour la manipulation et l'entreposage des produits chimiques devraient être respectés.

5.2 Préparation des solutions d'essai

Une estimation de la plus faible concentration de la ou des substances d'essai provoquant des effets sublétaux chez les larves de grenouille léopard est utile pour prévoir les concentrations chimiques appropriées pour les essais de toxicité chronique. À cette fin, on recommande d'effectuer un essai préliminaire de 14 jours avec un nombre réduit de répétitions et de variantes expérimentales (v. § 4.1). Les résultats d'un essai de détermination de la CL50 en conditions statiques après 96 heures (v. § 4.8.3), réalisé à 23 ± 2 °C en utilisant l'eau témoin/de dilution prévue pour l'essai de 14 ou 42 jours, pourraient également fournir ces renseignements (v. § 4.1 et note de bas de page 54 du présent document).

¹¹⁵ La connaissance des propriétés du produit chimique aidera à déterminer les précautions et exigences particulières requises pour sa manipulation et son expérimentation (p. ex. les essais dans une installation bien aérée, besoin d'utiliser un solvant, fréquence de renouvellement de la solution). L'information concernant la solubilité et la stabilité chimiques en eau est également utile dans l'interprétation des résultats des essais. La biodégradabilité et la stabilité sont des propriétés chimiques particulièrement importantes à comprendre avant de commencer un essai définitif par une longue

durée d'exposition, comme ceux décrits dans cette méthode. Lors de la deuxième série de l'étude interlaboratoire, le triclosan s'est rapidement dégradé au cours des essais définitifs, de sorte que les concentrations mesurées ont été ramenées à ≤ 5 % de la valeur nominale en 48 heures dans les deux laboratoires participants (Nautilus Environmental, 2020a). Il est fortement recommandé d'effectuer des essais préliminaires pour vérifier la stabilité d'un produit chimique avant de commencer l'essai définitif.

On prépare généralement les solutions d'essai du produit chimique en ajoutant les aliquotes d'une solution mère préparée dans de l'eau témoin/de dilution. Autrement, dans le cas de solutions concentrées ou de grands volumes, des quantités pondérées (à l'aide d'une balance adéquate) de produit chimique peuvent être ajoutées dans l'eau témoin/de dilution pour obtenir les concentrations nominales des solutions d'essai. Si des solutions mères sont utilisées, la concentration et la stabilité du produit chimique d'essai dans la solution devraient être déterminées avant l'essai. Les solutions mères soumises à une photolyse devraient être protégées contre la lumière. Les solutions mères instables doivent être préparées de nouveau, le cas échéant, afin de maintenir des concentrations constantes pour chaque renouvellement des solutions d'essai. Les solutions mères devraient être préparées en dissolvant le produit chimique dans de l'eau témoin/de dilution. En ce qui concerne les produits chimiques qui ne se dissolvent pas facilement dans l'eau, les directives fournies dans le document sur les essais de toxicité pour les organismes aquatiques visant des substances d'essai difficiles de l'OCDE (OCDE, 2019) devraient être suivies. On ne devrait pas utiliser d'*émulsifiants* ou de *dispersants* pour accroître la solubilité du produit chimique, sauf dans les cas où ces substances pourraient être formulées avec le produit chimique d'essai en vue de son utilisation commerciale normale. L'utilisation d'un solvant autre que de l'eau devrait être évitée dans la mesure du possible. Un solvant organique ou inorganique peut être utilisé pour la dissolution de la substance d'essai dans de l'eau de dilution lorsqu'aucune autre méthode acceptable de préparation de la solution d'essai n'est disponible. Le cas échéant, on doit préparer une solution témoin supplémentaire contenant l'eau témoin/de dilution et la même concentration d'agent solubilisant que celle contenue dans la solution la plus concentrée du produit chimique d'essai (c.-à-d. témoin du solvant). Ces agents devraient être utilisés avec parcimonie (c.-à-d. en utilisant le volume minimal nécessaire pour dissoudre ou mettre en suspension la substance d'essai dans l'eau de dilution) et leur concentration ne devrait pas dépasser celle ayant une incidence sur la survie, la croissance ou le développement de *L. pipiens* ou au plus 0,1 mL/L ou 100 mg/L dans toute solution d'essai; on recommande généralement des concentrations de solvant $\leq 20 \mu\text{L/L}$ (Hutchinson *et al.*, 2006; Green et Wheeler, 2013; OCDE, 2019; Young *et al.*, 2020). Dans les études

interlaboratoires d'Environnement et Changement climatique Canada, des témoins du solvant à 3 mg/L d'hydroxyde de sodium (NaOH) ont été utilisés avec succès parallèlement aux essais avec la thyroxine (série 1) et le triclosan (série 2); les témoins du solvant ont donné de bons résultats, avec une survie $\geq 80 \%$ et des augmentations semblables du développement et de la croissance par rapport aux témoins négatifs, ce qui indique des effets minimes du solvant (Nautilus Environmental, 2020a, 2020b). Une étude récente a examiné les effets sublétaux aigus ou chroniques de trois solvants sur les larves de *L. pipiens* à des concentrations de 10 à 100 $\mu\text{L/L}$ (Young *et al.*, 2020). L'étude indique que le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthanol devraient être utilisés à des concentrations $\leq 20 \mu\text{L/L}$ pour les amphibiens, et que l'acétone devrait être utilisée à des concentrations $\leq 50 \mu\text{L/L}$ pour *L. pipiens*, mais à des concentrations $\leq 10 \mu\text{L/L}$ pour les autres amphibiens, d'après la documentation (Young *et al.*, 2020). Une autre étude a évalué les effets de létalité aiguë de plusieurs solvants sur des larves de *Rana temporaria* (grenouille commune [européenne]), et a indiqué que l'acétone, l'éthanol et le chlorure de méthylène devraient être utilisés à des concentrations $\leq 10 \mu\text{L/L}$ pour ces organismes, et que le méthanol ne devrait pas être utilisé en raison du taux de mortalité survenant à des concentrations aussi faibles que 1 $\mu\text{L/L}$ (Marquis *et al.*, 2006). Si l'information sur les effets d'un solvant sur un organisme d'essai n'est pas connue, un essai préliminaire portant sur un solvant uniquement, dans le cadre duquel diverses concentrations du solvant sont utilisées, devrait alors être mené pour déterminer la concentration seuil susceptible de produire des effets pour ce qui est du solvant qui est étudié aux fins d'utilisation dans l'essai définitif. Si l'on utilise des solvants, il est préférable d'utiliser les produits suivants, sur la base des renseignements ci-dessus : DMSO, acétone, NaOH et éthanol¹¹⁶.

¹¹⁶ Les solvants recommandés par l'OCDE (2019) pour les essais de toxicité aquatique sont l'acétone, l'éthanol, le méthanol, l'alcool tert-butyle, l'acétonitrile, le diméthylformamide, le sulfoxyde de diméthyle et le triéthylèneglycol. On manque de données sur les amphibiens pour certains de ces solvants, c'est pourquoi les recommandations fournies ici sont plus sélectives. L'OCDE (2019) note également que l'acétone, l'éthanol et le méthanol peuvent entraîner une croissance bactérienne importante et une raréfaction de l'oxygène dans les systèmes d'essai aquatiques à renouvellement intermittent, et qu'il faudrait envisager d'utiliser des

Pour le témoin du solvant, il faut préparer au moins trois répétitions (avec une recommandation de quatre) pour chaque essai de 14 jours et au moins huit répétitions pour chaque essai de 42 jours (v. § 4.2).

La teneur en oxygène dissous des solutions d'essai, y compris les solutions témoins, devrait être mesurée après leur préparation. Par la suite, on devrait soit introduire les têtards et mettre en route l'essai (v. § 4.4), soit préaérer chaque solution d'essai avant d'introduire les têtards. Dans la plupart des cas, la préaération des solutions d'essai n'est pas nécessaire ou justifiée (v. note de bas de page 60 au § 4.3.4). Lorsque la préaération est justifiée (c.-à-d. après la préparation, la teneur en oxygène dissous d'une ou de plusieurs solutions d'essai est < 60 % ou > 100 % de saturation en air), on devrait suivre les directives pour la préaération des solutions indiquées au § 4.3.4.

5.3 Eau témoin/de dilution

L'eau témoin/de dilution peut être l'une des suivantes : de l'eau souterraine ou de surface (d'un cours d'eau, d'une rivière ou d'un lac) « non contaminée »; de l'eau reconstituée, du pH et de la dureté voulus (p. ex. simulant ceux de l'eau réceptrice); un échantillon particulier d'eau réceptrice si la situation locale présente un intérêt particulier; ou de l'eau déchlorée de la municipalité (v. § 2.3.5 et 3.4). L'eau utilisée comme eau témoin/de dilution est souvent la même que celle utilisée pour le maintien ou l'élevage des têtards/grenouilles (v. § 2.3.5), bien qu'elle puisse provenir d'une autre source. Le choix de l'eau témoin/de dilution dépend de l'objet de l'essai.

Si l'on doit évaluer l'effet toxique d'un produit chimique sur un milieu récepteur particulier, on peut préparer des échantillons de ce milieu dans un endroit à l'abri de l'influence du produit chimique, puis les utiliser comme eau témoin/de dilution. Par exemple, il peut s'agir d'évaluer les effets toxiques de déversements (réels ou potentiels) de produits chimiques ou d'applications intentionnelles d'un produit chimique (p. ex. épandage d'un pesticide) sur une étendue d'eau particulière. Si de l'eau réceptrice doit être utilisée comme eau témoin/de

dilution, une solution témoin distincte doit être préparée à l'aide de l'eau témoin/de dilution/d'élevage qui est normalement utilisée pour l'essai de toxicité de 14 ou 42 jours chez l'espèce *L. pipiens* et qui est capable d'atteindre régulièrement des résultats d'essai valides (v. § 4.1 et 4.7). Les difficultés et les coûts associés à la collecte et au transport d'échantillons d'eau réceptrice à utiliser comme eau témoin/de dilution, ainsi que les risques que l'eau de surface peut présenter pour les essais sur les amphibiens en raison de la présence d'organismes pathogènes potentiels, devraient également être pris en compte (v. § 3.4).

L'eau naturelle non contaminée du laboratoire peut également être utilisée pour évaluer l'effet toxique d'un produit chimique sur un milieu récepteur particulier, surtout lorsque des contraintes logistiques ou monétaires rendent peu pratiques le prélèvement et l'utilisation des eaux réceptrices ou s'il existe déjà une toxicité perturbatrice dans les eaux réceptrices. L'eau normale du laboratoire peut aussi servir d'eau témoin/de dilution dans d'autres situations (p. ex. l'évaluation préalable ou intralaboratoire de la toxicité du produit chimique).

5.4 Observations et mesures pendant l'essai

Outre les observations sur la toxicité décrites au § 4.4, d'autres observations et mesures sont nécessaires pendant les essais sur des produits chimiques.

Pendant la préparation des solutions et à chacune des périodes d'observation prescrites pendant l'essai, on devrait examiner chaque solution d'essai afin de détecter la présence et l'évolution du produit chimique (p. ex. odeur, couleur, opacité, *précipitation* ou *floculation* du produit chimique). Toute observation devrait être consignée.

Il est souhaitable et recommandé d'analyser les aliquotes des solutions d'essai afin de déterminer les concentrations de produits chimiques auxquelles les organismes d'essai sont exposés¹¹⁷. Si des produits

systèmes à renouvellement continu lors de l'utilisation de ces solvants.

¹¹⁷ Il n'est pas nécessaire d'effectuer ces analyses dans tous les cas, en raison des limites de l'analyse, des coûts à engager ou de l'existence de données techniques antérieures indiquant la stabilité du produit chimique en solution dans des conditions analogues à celles de l'essai. Les analyses chimiques sont particulièrement

chimiques doivent être mesurés, on devrait prélever des échantillons dans les concentrations d'essai à teneur supérieure, moyenne et inférieure et dans les solutions témoins, au début et à la fin de l'essai au minimum. Des échantillons supplémentaires peuvent être prélevés aux fins d'analyse au début et à la fin d'une période de renouvellement si la stabilité du produit chimique suscite des inquiétudes. Ces échantillons devraient être conservés, entreposés et analysés au moyen des meilleures méthodes éprouvées et validées avec des seuils de détection acceptables qui permettent d'établir la concentration du produit chimique visé en solution aqueuse.

Si les mesures chimiques indiquent que les concentrations ont fléchi de plus de 20 % pendant le renouvellement ou l'essai, la toxicité du produit chimique devrait être réévaluée au moyen d'un essai dans lequel les solutions sont renouvelées plus fréquemment que ≥ 3 fois par semaine, ou d'un essai utilisant un système à renouvellement continu, en fonction des objectifs de l'étude. Dans tous les essais au cours desquels on mesure les concentrations, la toxicité devrait être calculée et exprimée en fonction des concentrations mesurées, sauf s'il y a de motifs raisonnables de croire que les mesures chimiques ne sont pas exactes. Aux fins de ces calculs, on devrait caractériser chaque solution d'essai par la *moyenne géométrique* des concentrations mesurées auxquelles les organismes d'essai ont été exposés.

5.5 Paramètres d'essai et calculs

Le paramètre des essais de produits chimiques sera généralement une CL50 ou une autre CLp à la fin de l'essai, une Clp pour les paramètres de croissance (poids humide, biomasse, longueur totale) et les effets significatifs pour les paramètres de développement (stade de Gosner) (v. § 4.5 et 4.6).

Si des témoins supplémentaires (p. ex. solvant et/ou autre) sont utilisés, les résultats doivent être examinés pour déterminer s'ils satisfont aux critères de validité de l'essai de façon indépendante (v. § 4.7). L'essai est considéré comme non valide si le taux de mortalité des organismes témoins est $> 20\%$ (v. § 4.7) dans tout témoin supplémentaire ou dans le témoin de l'eau de dilution non traité. L'essai est également non valide si la moyenne combinée (pour toutes les répétitions de la même variante expérimentale) du stade final de développement (stade de Gosner) des organismes témoins survivants est $< SG 27$ pour l'essai de 14 jours et $< SG 33$ pour l'essai de 42 jours (v. § 4.7) dans n'importe quel témoin supplémentaire ou dans le témoin de l'eau de dilution non traitée. Si des solvants sont utilisés pour préparer les solutions d'essai, seules les données provenant du témoin du solvant devraient être utilisées pour calculer les paramètres statistiques impliquant les comparaisons des résultats de chaque série de concentrations d'essai avec les résultats des solutions témoins. Les données existantes ont démontré que d'autres techniques de traitement des données provenant des témoins de l'eau de dilution et du solvant entraîneront une augmentation bénéfique de la puissance (Green *et al.*, 2018). Cependant, l'essai de 42 jours a déjà été optimisé pour la puissance, et l'utilisation des témoins du solvant uniquement maintiendra le taux de faux positifs (Green *et al.*, 2018).

recommandables si (USEPA, 1985) : les solutions d'essai sont aérées; la substance d'essai est volatile, insoluble ou forme un précipité en solution; on sait que cette substance est adsorbée par les matériaux dont les récipients d'essai sont construits; ou on fait appel à un système à renouvellement continu. Certains cas (p. ex. l'essai de pesticides en vue de leur enregistrement) peuvent nécessiter la mesure des concentrations du produit chimique dans les solutions d'essai.

Section 6

Modes opératoires particuliers pour l'analyse d'échantillons d'eau contaminée

La présente section donne des instructions précises pour la collecte, la préparation et l'analyse des eaux contaminées (p. ex. les zones humides ou les eaux réceptrices touchées, les effluents, les éluviats, les lixiviats), en plus des modes opératoires décrits au § 4. Plus particulièrement, des orientations destinées aux évaluateurs et aux gestionnaires des risques liés aux sites contaminés sont fournies pour s'aligner sur les orientations précédemment publiées sur l'utilisation des essais sur les amphibiens pour l'évaluation des risques écologiques (PASCFC, 2010, 2019). Dans un récent examen des méthodes d'évaluation des risques écologiques pour les amphibiens, Johnson *et al.* (2017) ont encouragé des essais ciblés utilisant des méthodes normalisées avec des espèces d'amphibiens indigènes élevées en laboratoire, y compris des expositions conçues pour mesurer les effets sublétaux importants avant et après la métamorphose.

L'essai de 14 jours ou de 42 jours pourrait servir à l'analyse des échantillons d'eau contaminée (v. § 4.3.1), en fonction des objectifs de l'étude, des paramètres ciblés et des contaminants soupçonnés d'être préoccupants. Avant d'adopter l'une de ces options d'essai pour une utilisation périodique ou fréquente en vue de mesurer la toxicité des eaux de sites contaminés ou des eaux usées industrielles/municipales, on recommande de procéder à une évaluation comparative de ces options d'essai afin d'indiquer les paramètres et la durée (survie, croissance, développement, 14 jours ou 42 jours) qui sont les plus sensibles et les plus pertinents. Associée à des limites pratiques, telles que les ressources nécessaires à la réalisation de l'essai, l'évaluation comparative peut aider à sélectionner une option d'essai et un plan d'expérience. On pourrait utiliser l'une ou l'autre des options d'essai sous forme d'essais à renouvellement intermittent ou continu, en fonction des objectifs, de la nature de l'échantillon ou du volume nécessaire, entre autres.

Avant d'entreprendre un programme d'essai, il faudrait examiner sérieusement les volumes nécessaires d'échantillon d'essai. Il faudrait de grandes quantités d'échantillons pour les essais avec

renouvellement intermittent et continu, et la quantité diffère considérablement selon les deux options d'essai¹¹⁸. Puisque ces essais nécessitent d'importants volumes d'échantillons, les chercheurs pourraient envisager une approche par étapes. Les essais à concentration unique (un essai qui compare une solution avec concentration maximale à un témoin; v. § 6.5.1) peuvent être utilisés pour sélectionner des échantillons d'eau potentiellement contaminés afin de choisir ceux pour lesquels des essais plus définitifs (essais à concentrations multiples; v. § 4.6.2) pourraient être nécessaires. En outre, l'essai de 14 jours peut s'avérer utile pour sélectionner les échantillons présentant des effets positifs, pour éclairer les décisions relatives à

¹¹⁸ Pour un essai de 14 jours, avec 7 L de solution d'essai par répétition (c.-à-d. pour dix organismes d'essai) et trois répétitions par concentration d'essai, le volume nécessaire pour préparer les répétitions d'eau contaminée contenant la concentration maximale serait d'environ 23 L (en tenant compte d'un échantillon supplémentaire pour les déversements et les analyses physicochimiques). Sept concentrations plus un témoin dans une série géométrique comprenant une concentration maximale (p. ex. 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0 %) nécessiteraient environ deux fois plus d'échantillons d'essai que pour la concentration de 100 % seule et donc l'essai nécessiterait environ 46 L d'eau contaminée pour la mise en place. Un volume supplémentaire d'environ 37 L serait nécessaire pour chaque renouvellement de 80 % de l'eau (au minimum trois fois par semaine pendant deux semaines).

Pour un essai de 42 jours, avec 7 L de solution d'essai par répétition (c.-à-d. pour dix organismes d'essai) et quatre répétitions par concentration d'essai, le volume nécessaire pour préparer les répétitions d'eau contaminée contenant la concentration maximale serait d'environ 30 L (en tenant compte d'un échantillon supplémentaire pour les déversements et les analyses physicochimiques). Sept concentrations plus un témoin dans une série géométrique comprenant une concentration maximale (p. ex. 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0 %) nécessiteraient environ deux fois plus d'échantillons d'essai que pour la concentration de 100 % seule et donc l'essai nécessiterait environ 60 L d'eau contaminée pour la mise en place. Un volume supplémentaire d'environ 48 L serait nécessaire pour chaque renouvellement de 80 % de l'eau (au minimum trois fois par semaine pendant six semaines).

d'autres essais toxicologiques (p. ex. l'essai de 42 jours), ou comme essai préliminaire avant un essai de 42 jours à plus long terme, dans les cas où l'on ne prévoit pas d'effets sur le développement¹¹⁹.

6.1 Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons

Les contenants utilisés pour le transport et l'entreposage des échantillons d'eau doivent être fabriqués d'un matériau non toxique. Nous recommandons des contenants souples de polyéthylène ou de polypropylène, pour le transport de l'eau potable (p. ex des contenants en plastique Reliance^{MC}). Le volume de ces contenants peut se contracter pour s'adapter à l'intérieur d'une glacière, et le volume d'air intérieur peut être maintenu au minimum, lorsque l'on prélève des fractions de l'échantillon au laboratoire pour l'essai toxicologique ou les analyses chimiques. Les contenants doivent être soit neufs, soit nettoyés à fond et rincés à l'eau témoin/de dilution ou à l'eau désionisée ou distillée avant utilisation. Il faudrait également les rincer avec l'échantillon à prélever. Chaque contenant d'échantillons devrait être rempli entièrement afin d'en exclure l'air.

La plupart des essais effectués avec de l'eau contaminée seront réalisés dans un laboratoire contrôlé. En raison des volumes importants d'échantillons requis pour ces essais, la collecte d'échantillons sera un compromis entre les contraintes logistiques et pratiques (p. ex. la durée, l'effort et le coût). Les échantillons d'eau contaminée destinés à des essais à concentration unique ou à des essais définitifs à concentrations multiples complets peuvent être prélevés en une

¹¹⁹ L'utilisation de l'essai de 14 jours comme essai de dépistage ou préliminaire pour l'essai de 42 jours devrait se faire avec prudence. Les deux essais diffèrent par le stade des têtards utilisés pour commencer l'essai ainsi que par la durée de l'essai, et sont donc conçus pour obtenir des résultats différents. L'essai de 14 jours évalue principalement la survie et la croissance des têtards avant la métamorphose. En revanche, l'essai de 42 jours couvre une période de changements métamorphiques et est conçu pour saisir les répercussions potentielles sur les systèmes HPT et HPG (v. § 1.1 et 2.1). La valeur de l'essai de 14 jours en tant qu'outil de dépistage ou préliminaire pour l'essai de 42 jours peut donc être remise en question lorsque des composés perturbateurs de la thyroïde présentent un intérêt, par exemple.

seule fois pendant toute la durée de l'essai ou à plusieurs reprises pendant la période de l'essai, en fonction de nombreux facteurs, notamment les objectifs de l'étude, l'aspect pratique et la disponibilité des ressources pour l'échantillonnage, et/ou la stabilité connue ou prévue des échantillons. Si un seul échantillon est utilisé tout au long de l'essai, il pourrait être utile de le diviser en plusieurs récipients distincts (p. ex. plusieurs sous-échantillons) lors du prélèvement ou de la réception au laboratoire. Chaque sous-échantillon resterait scellé jusqu'à son utilisation pour un nombre prédéterminé de renouvellements de la solution d'essai. Cette approche est proposée en option dans plusieurs méthodes d'Environnement et Changement climatique Canada à plus long terme nécessitant le renouvellement des solutions, afin de minimiser la probabilité que l'échantillon se dégrade au fil du temps en raison de procédés physiques et chimiques tels que la volatilisation, l'oxydation et la dégradation photochimique ou microbienne (EC, 2007, 2011, 2017).

Lorsque l'on sait ou prévoit que la toxicité de l'eau contaminée subira un changement important si elle est entreposée jusqu'à six semaines avant d'être utilisée, des échantillons frais peuvent être prélevés à plusieurs reprises, à des intervalles d'échantillonnage régulièrement espacés. Les intervalles d'échantillonnage peuvent être raccourcis (c.-à-d. échantillonnage plus fréquent) pour les eaux contaminées qui, d'après ce que l'on sait ou prévoit, sont particulièrement instables, ou allongés si la stabilité est moins préoccupante.

L'analyse de l'eau contaminée devrait commencer dès que possible après le prélèvement de l'échantillon. En règle générale, Environnement et Changement climatique Canada recommande de démarrer les essais dans un délai d'un jour après l'échantillonnage, dans la mesure du possible, et exige qu'ils commencent au plus tard trois jours après l'échantillonnage. Toutefois, en raison des contraintes logistiques et pratiques inhérentes aux volumes d'échantillons potentiellement requis pour cet essai, il est recommandé de réduire autant que possible la durée de conservation des échantillons, ce qui devrait être fait en fonction des objectifs du projet, de la stabilité de l'échantillon et des contaminants auxquels on s'intéresse. Des échantillons de sédiments ou d'autres matières solides pourraient également être prélevés en vue

d'une extraction et d'essais ultérieurs. De même, on devrait mettre à l'essai ces échantillons dès que possible. Il faudrait suivre les modes opératoires indiqués dans Environnement Canada (1994) pour la préparation des éutriats.

En général, un échantillon de 150 L est suffisant pour un essai à concentration unique de 14 jours, avec trois renouvellements hebdomadaires de l'eau, l'analyse chimique de routine connexe et tous les ajustements nécessaires ou la prise en compte des déversements/rinçages. Pour les essais à concentrations multiples de 14 jours ou pour les essais de 42 jours, les exigences en matière de volume d'échantillon seront beaucoup plus élevées (v. note de bas de page 118). Immédiatement après l'avoir rempli, chaque contenant d'échantillons doit être scellé et étiqueté ou codé. L'étiquetage et les enregistrements connexes qui accompagnent cette opération doivent comprendre au moins un code ou une description permettant d'identifier le type d'échantillon, la source, l'emplacement précis (p. ex. le plan d'eau, la latitude et la longitude), le numéro de la répétition et la date de prélèvement; il faudrait également inclure le nom et la signature des préposés au prélèvement. On ne devrait pas soumettre aux essais les échantillons arrivant au laboratoire non étiquetés ou non codés et on ne devrait pas non plus soumettre automatiquement à l'analyse des échantillons parvenant au laboratoire dans des contenants partiellement remplis, parce que les toxiques volatils s'échappent dans le volume d'air. Cependant, si on sait que la volatilité ne fait pas problème, le chercheur peut, à son gré, soumettre ses échantillons aux essais.

On doit s'efforcer de garder tous les échantillons¹²⁰ au frais (1 à 7 °C, de préférence 4 ± 2 °C) durant le transport. Lors du prélèvement, les échantillons tièdes (plus de 7 °C) devraient être ramenés à 1 à 7 °C, à l'aide de glace ordinaire (et non de la glace sèche) ou de sachets réfrigérants. Au besoin, on devrait ajouter dans le contenant de transport des sachets réfrigérants, de la glace ordinaire ou d'autres moyens de réfrigération, afin de maintenir la température de l'échantillon dans la fourchette de 1 à

¹²⁰ Cela s'applique aux zones humides contaminées ou aux eaux réceptrices, aux effluents, aux lixiviats et aux éutriats, ainsi qu'aux échantillons de sédiments ou de déchets solides qui seront soumis à une extraction en laboratoire.

7 °C durant le transport. Pendant ce dernier ou pendant l'entreposage, les échantillons ne doivent pas geler.

Il faut noter la date de réception des échantillons au laboratoire et il faut mesurer, puis consigner la température de l'échantillon à la réception. On peut amener à la température d'essai, immédiatement ou pendant la nuit, des échantillons dont on a besoin et les utiliser dans l'essai. On doit garder dans l'obscurité tout échantillon ou partie d'échantillon conservé en vue d'une utilisation ultérieure ou d'éventuels essais supplémentaires dans des récipients étanches, sans espace libre, à 4 ± 2 °C.

6.2 Préparation des solutions d'essai

Juste avant le transvasement, chaque contenant renfermant un échantillon ou sous-échantillon d'eau doit être agité vigoureusement aux fins d'homogénéisation et de remise en suspension des matières décantables. Selon la nature de l'échantillon et les objectifs de l'essai, l'homogénéisation pourrait ne pas être requise. Tout mélange doit être exécuté à fond. En cas de renouvellement intermittent, seule la quantité d'échantillons nécessaire à ce moment-là pour commencer l'essai ou effectuer le renouvellement de la solution devrait être retirée de la réserve et ajustée à la température de l'essai. Juste avant l'emploi, il faut mesurer la teneur en OD et le pH de chaque échantillon. Au besoin, chaque solution d'essai devrait être aérée (v. § 4.3.4) avant d'être répartie dans les récipients d'essai de répétition.

Il n'est habituellement pas nécessaire (ni recommandé) de filtrer les échantillons. La filtration pourrait avoir pour effet de supprimer des solides en suspension ou décantables qui sont caractéristiques de l'échantillon et qui pourraient en accroître ou en altérer la toxicité. Toutefois, si un échantillon d'eau contaminée contient des débris ou des organismes indigènes susceptibles d'être confondus avec les organismes d'essai ou de les attaquer, l'échantillon doit être filtré (p. ex. ≤60 µm) avant usage (USEPA, 1994). De même, pour réduire le risque d'introduction d'organismes pathogènes pouvant être présents dans toute eau contaminée, les échantillons (p. ex. zone humide, étang, eau d'amont ou réceptrice) peuvent être filtrés davantage à l'aide d'un filtre plus fin (taille de pore de 0,45 à 5 µm) (v.

§ 2.3.5 et 3.4). Il convient de noter que la filtration peut ne pas atténuer le risque d'infection *Ranavirus* en raison de la petite taille des virus (environ 150 nm) (v. § 3.4 et l'annexe E). Si l'on se préoccupe des effets de la filtration sur la toxicité, un deuxième essai devrait être exécuté en parallèle sur une portion non filtrée de l'échantillon ou du sous-échantillon.

6.3 Eau témoin/de dilution

Pour les essais sur des échantillons d'eau contaminée aux fins de surveillance et d'atténuation des contaminants, l'eau témoin/de dilution devrait avoir la même origine que l'eau ayant permis antérieurement au laboratoire d'obtenir des résultats valides. Si la situation locale présente un intérêt particulier, un échantillon d'eau réceptrice ou d'eau d'« amont » ou d'eau de laboratoire ajustée au pH et à la dureté du site de prélèvement (c.-à-d. de l'eau reconstituée) peut être utilisé comme eau témoin/de dilution (v. § 2.3.5, 3.4 et 4.1, ainsi que la note de bas de page 27 au § 2.3.5). Le choix de l'eau témoin/de dilution est fonction de l'objet de l'essai. Étant donné que les résultats d'un essai peuvent différer selon l'origine de l'eau utilisée, ce choix doit être effectué une fois les objectifs de l'essai arrêtés. Les difficultés et les coûts associés au prélèvement et à l'expédition des échantillons d'eau réceptrice qui serviront d'eau témoin/de dilution devraient également être pris en considération, tout comme les risques que peuvent poser l'eau de surface pour les amphibiens en raison de la présence d'organismes pathogènes (v. § 3.4).

Il pourrait être souhaitable d'utiliser une eau réceptrice non contaminée ou une eau d'amont (p. ex. une zone humide, un étang ou l'eau d'une rivière en amont) comme eau témoin/de dilution si l'on veut recueillir des informations propres au site quant à l'impact toxique possible de l'eau contaminée sur un milieu récepteur particulier (v. la justification au § 5.3). Il faudrait se conformer aux conditions précisées au § 6.1 quant au prélèvement, au transport et à l'entreposage des échantillons de cette eau réceptrice. Tout échantillon d'eau réceptrice ou d'eau d'amont utilisée comme eau témoin/de dilution dans un essai sur des échantillons d'eau contaminée devrait être filtré conformément aux recommandations visant l'eau témoin/de dilution naturelle, décrites au § 3.4. Si l'on utilise un tel échantillon, il faut aussi préparer une solution

témoin distincte avec l'eau témoin du laboratoire normalement utilisée pour effectuer des essais avec des têtards de *Lithobates pipiens* (c.-à-d. de l'eau de maintien ou une autre eau de laboratoire acceptable; v. § 4.1.). Le taux de survie, la croissance et le développement des têtards (v. § 4.6.1) dans l'eau témoin du laboratoire doivent être comparés à ceux obtenus pour l'échantillon d'eau réceptrice.

6.4 Observations et mesures pendant l'essai

On doit déterminer le taux de survie, la croissance et le développement à la fin de l'exposition, selon les indications du § 4.6.

On devrait observer la couleur, la *turbidité*, l'odeur, l'homogénéité (c.-à-d. la présence de solides flottants ou décantables) et la présence d'organismes indigènes (c.-à-d. d'autres organismes qui pourraient constituer une menace ou entrer en concurrence avec les organismes d'essai) dans l'échantillon de zone humide contaminée ou d'eau de surface touchée, d'eau réceptrice, d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat au moment de la préparation des solutions d'essai. Il faudrait noter toute réaction ou modification manifeste des solutions d'essai lors de la dilution dans l'eau ou au cours de l'essai, notamment la précipitation, la floculation, la formation de mousse, l'odeur et le changement de couleur ou de turbidité.

Pour les échantillons d'eau ayant une teneur appréciable en matières solides, il est souhaitable de mesurer le total des matières en suspension et des matières décantables (APHA *et al.*, 2017) dès leur réception, dans le cadre de la description globale de l'échantillon et de ses caractéristiques susceptibles d'influencer les résultats de l'essai de toxicité.

6.5 Paramètres d'essai et calculs

Les paramètres des essais effectués avec des échantillons d'eau contaminée ou d'eaux usées industrielles sont généralement les paramètres standards décrits au § 4.6.

Les essais visant à évaluer et à gérer le risque de contamination de l'eau sur les sites peuvent être des essais à concentration multiple ou des essais à concentration unique. Si l'on utilise un plan d'expérience à concentrations multiples et que l'on veut calculer la CL_p, les CI_p et les effets sur le

développement, il faudrait normalement suivre les indications relatives au nombre de répétitions et aux concentrations d'essai fournies dans les § 4.1 et 4.2 pour ce plan d'expérience. Les essais à concentration unique sont souvent d'un meilleur rapport coût-efficacité lorsqu'il s'agit de déterminer si l'on est en présence ou non d'une toxicité mesurable ou d'évaluer préalablement la toxicité relative d'un nombre élevé d'échantillons d'eau contaminée. Le test d'hypothèse est souvent le premier et/ou le seul choix des chercheurs pour l'analyse des essais à concentration unique. Toutefois, le plan d'expérience décrit ici, en particulier le nombre de répétitions, n'a pas été optimisé pour tous les types de tests d'hypothèses. Les chercheurs devraient tenir compte des paramètres visés (p. ex. la mortalité, la croissance, le développement), l'ampleur de l'effet biologique attendu, les objectifs de l'étude, les analyses statistiques à utiliser et la puissance statistique avant de commencer l'expérience. Ces sources de renseignements peuvent être utilisées pour déterminer le nombre de répétitions. En général, pour un essai à concentration unique, tous les modes opératoires décrits dans la présente méthode d'essai s'appliquent; toutefois, le nombre de répétitions de l'échantillon d'essai pourrait varier entre 4 et 8. Pour les essais à concentration unique, le nombre de répétitions choisi doit être justifié *a priori*. Le § 6.5.1 fournit des indications supplémentaires sur l'utilisation des essais à concentration unique.

6.5.1 Variations des plans d'expérience et de l'analyse

Les essais toxicologiques peuvent porter sur une seule concentration (p. ex. un échantillon d'essai non dilué ou une concentration prescrite d'un produit chimique d'essai) et sur un témoin. Les essais à concentration unique sont souvent d'un bon rapport coût-efficacité lorsqu'il s'agit de déterminer si l'on est en présence ou non d'une toxicité mesurable ou d'évaluer préalablement la toxicité relative d'un nombre élevé d'échantillons. Les analyses statistiques et les paramètres à mesurer dépendront des objectifs de l'étude, mais ils pourraient englober les cotes arbitraires « satisfaisant » ou « non satisfaisant », ou un pourcentage d'effet par rapport aux témoins à une concentration donnée. On trouvera dans Environnement Canada (2005) des indications détaillées sur l'analyse statistique des données quantiques (c.-à-d. le taux de survie) recueillies dans le cadre de divers plans d'expérience

comportant plusieurs lieux d'échantillonnage. Le choix de l'essai statistique se fonde sur plusieurs considérations, notamment :

- le type de comparaison à établir (p. ex. une série complète de comparaisons par paires entre tous les lieux d'échantillonnage ou une comparaison de la réponse obtenue pour chaque lieu et pour le témoin seulement);
- l'existence prévue d'un gradient chimique ou d'un gradient dans la réponse biologique¹²¹;
- le nombre et le type de répétitions (de laboratoire ou prélevées sur le terrain).

Environnement Canada (2005) a également fourni des données statistiques détaillées sur l'analyse des mesures quantitatives¹²², que l'on peut appliquer facilement aux données sur la croissance des amphibiens (c.-à-d. la longueur et le poids des têtards à la fin de l'essai) dans un scénario comportant plusieurs lieux d'échantillonnage. Si on doit comparer les résultats obtenus pour la seule station d'échantillonnage à l'étude avec ceux obtenus pour un site témoin ou avec une eau témoin, un essai *t*¹²³ convient habituellement à l'analyse statistique (v. § 3.2 dans EC, 2005). Lorsque plus d'une station d'échantillonnage (variante expérimentale) est à l'étude et que l'expérimentateur souhaite comparer de nombreuses stations

¹²¹ Dans un tel cas, on détermine le gradient pendant la mise au point du schéma expérimental (donc, *a priori*) et non après la collecte des données. On trouvera au § 3.3 d'EC (2005) des indications relatives aux gradients d'effet. Au besoin, on devrait demander à un statisticien des conseils sur les analyses de données lorsqu'on prévoit l'existence d'un gradient.

¹²² Pour l'analyse des données sur la croissance, il faudrait consulter les § 3.2 et 3.3 d'EC (2005), qui renferment des indications sur l'analyse de mesures quantitatives pour une seule station d'échantillonnage et de mesures quantitatives pour plusieurs stations d'échantillonnage, respectivement. Il faudrait aussi consulter le § 7.5 d'EC (2005), qui présente d'autres détails sur les essais de comparaisons multiples aux fins des essais d'hypothèse; toutefois, le calcul de la CSEO ou de la CMEQ n'est pas recommandé ici.

¹²³ L'essai *t* suppose une égalité des variances entre les groupes, mais on peut le modifier pour tenir compte d'une inégalité des variances (EC, 2005).

d'échantillonnage entre elles ou avec la station d'échantillonnage témoin, il peut avoir recours à des ANOVA et à plusieurs essais de comparaisons (et équivalents non paramétriques) (v. § 3.3 dans EC, 2005). Le choix de l'essai se fonde sur les trois éléments décrits ci-dessus pour les essais quantiques, de même que sur la satisfaction des hypothèses de *normalité* et d'*homoscédasticité*.

Une étude très préliminaire pourrait ne disposer que d'un seul échantillon d'eau d'essai (c.-à-d. d'eau de site effectivement ou potentiellement contaminé) et d'un échantillon d'eau provenant d'un site témoin en exemplaire unique. Un simple examen des résultats pourrait inspirer la conception d'études plus approfondies. En principe, on pourrait faire une évaluation préliminaire avec les échantillons prélevés en de nombreuses stations, mais sans répétitions prélevées sur le terrain ou de laboratoire (intra-échantillons). L'objectif pourrait être de déterminer un nombre réduit de stations d'échantillonnage méritant une étude plus approfondie ou plus détaillée. Dans ce cas, les occasions d'analyse statistique seraient limitées (EC, 2005).

Une étude plus habituelle d'un site contaminé comporterait le prélèvement d'échantillons répétés en plusieurs endroits, par les mêmes méthodes, puis leur comparaison avec des échantillons répétés de l'eau provenant d'un site témoin et/ou de l'eau témoin de laboratoire. Plusieurs pistes s'offrent à l'analyse, selon le type et la qualité des données. Dans les études portant sur plusieurs lieux, le type de répétitions (prélevées sur le terrain ou de laboratoire) influencerait sur l'interprétation des résultats. Si des échantillons répétés prélevés sur le terrain et des récipients d'essai/enceintes expérimentales (répétitions de laboratoire) ont été mis à l'essai, on devrait consulter un statisticien pour connaître les choix d'analyse. Si l'essai n'a porté que sur des échantillons subdivisés de laboratoire (répétitions) et qu'aucun échantillon répété de terrain

n'a été étudié, il est alors difficile de tirer des conclusions statistiquement robustes au sujet des différences dues au lieu d'échantillonnage. Les répétitions de laboratoire ne révéleraient, entre les échantillons, que des différences supérieures à la variabilité de base des modes opératoires intralaboratoire pour la préparation et l'exécution de l'essai. La variabilité des échantillons due au lieu ne serait pas véritablement évaluée par l'analyse statistique, mais elle contribuerait à toute différence dans les résultats de l'essai associée au lieu du prélèvement.

Si on voulait comparer les résultats de l'essai des échantillons répétés de chaque lieu d'échantillonnage aux résultats donnés par les échantillons du site témoin, divers essais sont recommandés, selon que les échantillons présentent un gradient d'effet ou non et que le nombre de répétitions est égal ou inégal (v. section 3 dans EC, 2005).

Dans une étude portant sur de nombreux endroits, on pourrait vouloir savoir quels sont les échantillons provenant de divers endroits ayant présenté des résultats différant statistiquement des résultats des autres échantillons et quels sont les échantillons différant de l'échantillon ou des échantillons du site témoin et/ou de l'échantillon ou des échantillons témoins de laboratoire. Cette situation pourrait comporter le prélèvement d'échantillons dans un certain nombre d'endroits à des distances de plus en plus grandes par rapport à la source ponctuelle de contamination ou au site contaminé, auquel cas on pourrait vouloir connaître quels sont les lieux d'échantillonnage ayant fourni des échantillons présentant une toxicité significativement supérieure à celle des autres et, ainsi, quels emplacements méritent particulièrement d'être dépollués. Il faudrait suivre les conseils fournis dans les § 3.1, 3.3 et 7.5 d'EC (2005), où l'on trouve par ailleurs d'autres détails, des essais de rechange et des essais non paramétriques.

Section 7

Rapports à produire

Dans le rapport sur chaque essai, il *faut* préciser si on s'est écarté des exigences énoncées dans les sections 2 à 6 et, le cas échéant, fournir des détails sur ces écarts. Le lecteur doit pouvoir juger si, grâce aux conditions et aux modes opératoires s'appliquant avant et pendant l'essai, les résultats sont valides et acceptables pour l'usage qu'il entend en faire.

Dans le § 7.1, nous énumérons les points (renseignements) à intégrer dans le rapport sur chaque essai et, dans le § 7.2, les renseignements soit à intégrer dans le rapport, soit à communiquer séparément dans un rapport général, soit à archiver pour au moins cinq années. Certains programmes de surveillance, les protocoles connexes d'essai ou des règlements pourraient exiger de faire figurer dans le rapport sur l'essai certains des renseignements particuliers que l'on énumère dans le § 7.2 (p. ex. des détails sur les matières étudiées ou sur les modes opératoires et les conditions explicites ayant coïncidé avec le prélèvement des échantillons, leur manipulation, leur transport ou leur entreposage) ou de les reléguer à l'*archivage*.

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

On doit archiver, au laboratoire, pour au moins cinq ans, les détails se rapportant aux modes opératoires, aux conditions et aux constatations de l'essai, qui ne sont pas reproduits dans le rapport sur l'essai ni dans le rapport général, de sorte que l'on peut fournir l'information convenable si l'essai doit faire l'objet d'une vérification (audit) (§ 7.2).

7.1 Exigences minimales pour le rapport sur l'essai

Voici la liste des renseignements à intégrer dans chaque rapport.

7.1.1 Substance ou matière d'essai

- une description succincte du type d'échantillon (p. ex. substance chimique, produit chimique, effluent, lixiviat, élutriat, eau réceptrice) ou le code attribué à l'échantillon par le personnel du laboratoire;
- des renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon ou sous-échantillon;
- la date du prélèvement de chaque échantillon ou sous-échantillon; la date et l'heure de leur réception au laboratoire;
- pour les eaux contaminées ou réceptrices, une mesure de la température de l'échantillon ou, s'il s'agit de plusieurs sous-échantillons, d'un seul de ces sous-échantillons, dès réception au laboratoire;
- la mesure de l'oxygène dissous et du pH d'un échantillon ou d'un sous-échantillon d'eaux contaminées ou réceptrices, juste avant sa préparation et son utilisation dans le cadre d'un essai de toxicité;
- pour les échantillons d'élutriat ou de tout liquide extrait de sédiments ou de solides similaires, les dates de production et d'utilisation de l'échantillon; la description du processus de préparation;
- les dates ou jours de l'essai où des échantillons individuels ou des sous-échantillons ont été utilisés, le cas échéant.

7.1.2 Organismes d'essai

- l'espèce et l'origine des organismes d'essai et des géniteurs, le cas échéant;
- l'âge (jours depuis la fécondation, si disponible) ou le temps écoulé depuis la collecte, et le stade de développement des têtards au début de l'essai;
- le stade de développement (SG), longueur totale du corps et le poids humide (moyenne \pm écart-type) des organismes représentatifs au début de l'essai;
- tout aspect, comportement ou traitement inhabituel des organismes avant leur emploi dans l'essai;
- le taux de mortalité cumulée (doit être $\leq 10\%$; § 2.3.8), pour tout lot de têtards au cours des cinq jours précédant le début de l'essai.

7.1.3 Installations et appareillage expérimentaux

- le nom et l'adresse du laboratoire d'essai;
- le nom de la personne ou des personnes exécutant l'essai (ou chacun de ses éléments) et vérification des résultats.
- une courte description des récipients d'essais (taille, forme, type de matériau).

7.1.4 Eau témoin/de dilution

- le ou les types et la ou les sources d'eau utilisés comme eau témoin/de dilution;
- les caractéristiques mesurées de l'eau témoin ou de dilution, avant le début de l'essai ou au début de l'essai;
- le type et la quantité de toute substance chimique ajoutée à l'eau témoin/de dilution.

7.1.5 Méthode d'essai

- la désignation de la méthode d'essai biologique utilisée (c.-à-d. conformément au présent document);

- une courte indication et description des options d'essai choisies (p. ex. essai de 14 jours ou de 42 jours; essai à renouvellement intermittent ou continu);
- une courte description des modes opératoires à utiliser lorsqu'un échantillon, un sous-échantillon ou une solution d'essai a été filtré, décanté ou ajusté (p. ex. à la dureté ou au pH voulus);
- le plan d'expérience et la description du mode opératoire, s'il comporte des manipulations spéciales (p. ex. renouvellement des solutions d'essai autrement que trois fois par semaine, ou mode et taux d'échange des solutions d'essai, s'il s'agit d'un renouvellement continu; préparation et utilisation d'élutriats; préparation et utilisation de solvants et, le cas échéant, témoin du solvant);
- une courte description de la fréquence et de la nature de toutes les observations et mesures effectuées pendant l'essai;
- le titre et la désignation des programmes et des méthodes de calcul des paramètres statistiques.

7.1.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- le plan et la description de tout écart par rapport aux conditions et aux modes opératoires exposés dans le présent document ou de toute exclusion de ces conditions et modes opératoires;
- le nombre, la concentration, le volume et la puissance des solutions d'essai, y compris les témoins;
- le nombre d'organismes par récipient d'essai et le nombre de répétitions par variante expérimentale;
- une brève description (y compris le mode opératoire, le taux et la durée) de l'aération préalable éventuelle des solutions d'essai;
- un bref énoncé concernant l'aération (y compris le taux et la durée) des solutions d'essai pendant l'exposition des organismes d'essai;

- les dates de début et de fin de l'essai;
- la fréquence et le taux de renouvellement des solutions d'essai;
- les types d'aliments, ainsi que le régime alimentaire et la ration pendant l'essai;
- toutes les mesures requises (v. § 4.4) de la température, du pH, de l'oxygène dissous (mg/L et pourcentage de saturation), de la conductivité et de l'ammoniac dans les solutions d'essai (y compris les témoins), effectuées au cours de l'essai;
- un bref énoncé indiquant la date et le type de l'essai effectué avec un toxique de référence; si l'essai de toxicité de référence ou le témoin positif a été réalisé 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 conditions et modes opératoires exigés pour l'essai toxicologique de référence dans le présent document.
- pour chaque variante expérimentale, y compris le ou les témoins : longueur totale corrigée moyenne (\pm écart-type), poids humide corrigé et biomasse corrigée (exprimée en poids humide) à la fin de l'essai, tels qu'ils ont été utilisés pour le calcul de la CIp;
- pour chaque variante expérimentale, y compris le ou les témoins : stade moyen de Gosner à la fin de l'essai, en fonction de la moyenne des répétitions; toute observation d'un développement anormal ou asynchrone; toute apparence inhabituelle (c.-à-d. malformations ou lésions grossièrement visibles) ou tout comportement des organismes d'essai ainsi que le stade de développement approximatif enregistré au cours de toute période d'observation;
- toute CL50 (y compris sa limite de confiance à 95 %, la méthode quantique utilisée et, si on l'a calculée, la pente) que l'on a déterminée; toute CLp (p. ex. la CL25) que l'on a calculée;
- toute CIp (et sa limite de confiance à 95 %) qui a été déterminée d'après les données sur la longueur totale corrigée, le poids humide corrigé et la biomasse corrigée; les détails concernant toute transformation des données et l'indication des méthodes statistiques quantitatives utilisées ou des modes opératoires appliqués aux données;

7.1.7 Résultats

- pour chaque répétition de la solution d'essai (y compris chacune des répétitions témoins) : le nombre de spécimens morts et le taux de mortalité dans chaque récipient d'essai, tels qu'ils ont été consignés au cours de chaque période d'observation pendant l'essai; le nombre de têtards ayant atteint le SG 42 avant la fin de l'essai et la date de leur retrait de l'essai; le stade moyen de Gosner à la fin de l'essai;
- pour chaque variante expérimentale (c.-à-d. chaque concentration, y compris le témoin) : taux moyen (\pm écart-type) de mortalité, à la fin de l'essai;
- pour chaque variante expérimentale témoin : le taux moyen combiné et cumulatif (dans le temps) (\pm écart-type) des organismes d'essai morts à chaque période d'observation et à la fin de l'essai, utilisé pour le paramètre de survie pour valider l'essai; le stade moyen de Gosner à la fin de l'essai, utilisé pour le paramètre de développement pour valider l'essai;
- pour les essais à concentrations multiples de 42 jours : résultats de tous les essais concernant les effets de la variante expérimentale sur le développement (stade de Gosner), y compris toute variante significativement différente du ou des témoins; l'indication des méthodes statistiques utilisées ou des modes opératoires appliqués aux données;
- l'existence de valeurs aberrantes et la justification de leur suppression;
- à l'égard d'un essai avec une substance chimique, l'indication selon laquelle les résultats se fondent sur des concentrations nominales ou mesurées d'une ou de substances ou de produits chimiques; toutes les valeurs des concentrations mesurées;

- les résultats et la durée de tout essai de toxicité effectué avec le toxique de référence conjointement avec l'essai définitif de toxicité; le cas échéant, la moyenne géométrique (± 2 ET) calculée pour le même toxique de référence dans le laboratoire, à la faveur d'essais antérieurs fondés sur les modes opératoires et les conditions des essais de toxicité de référence décrits dans le présent document;
- toute anomalie dans le déroulement de l'essai, tout problème observé et toute mesure corrective prise.

7.2 Exigences supplémentaires

La liste suivante de renseignements doit soit figurer dans le rapport sur l'essai ou le rapport général, soit être archivée pour au moins cinq années. Les renseignements déposés doivent inclure ce qui suit :

- l'enregistrement de la chaîne de conservation des échantillons prélevés sur le terrain et des autres échantillons analysés dans un dessein de surveillance ou d'assainissement;
- une copie du dossier d'acquisition de l'échantillon ou des échantillons;
- les résultats d'analyses chimiques de l'échantillon ou des échantillons ne figurant pas dans le rapport sur l'essai;
- les notes d'observations et de mesures en laboratoire enregistrées pendant l'essai;
- les notes de laboratoire et les cartes de contrôle portant sur les essais de toxicité de référence;
- des renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des appareils.

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

7.2.1 Substance ou matière d'essai

- le nom et la signature des préleveurs et/ou des fournisseurs de l'échantillon ou sous-échantillon ou des échantillons ou sous-échantillons;

- l'enregistrement des fiches d'inscription de l'échantillon ou du sous-échantillon; tout renseignement (p. ex. code, description de l'échantillon, date/heure d'échantillonnage) inscrit sur la ou les étiquettes du ou des récipients contenant l'échantillon, description du récipient contenant l'échantillon (taille et matériau);
- le volume de l'échantillon ou sous-échantillon ou des échantillons et sous-échantillons;
- les conditions de transport et d'entreposage (p. ex. durées, dans le récipient scellé, dans l'obscurité; température durant l'entreposage au laboratoire; mention si les échantillons et sous-échantillons étaient gelés, ou partiellement gelés, à l'arrivée);
- l'apparence (p. ex. odeur, couleur) et l'état (p. ex. température, conservation à l'obscurité, dans un récipient scellé) des échantillons ou sous-échantillons à sa réception et pendant l'entreposage;
- tout autre renseignement obtenu pour les échantillons prélevés sur le terrain (p. ex. les renseignements fournis ou conservés pendant le prélèvement des échantillons) ou les échantillons de substances chimiques (impuretés, additifs, formules structurales, etc.).

7.2.2 Organismes d'essai

- les certificats de confirmation taxonomique de l'espèce, y compris le nom de la ou des personnes ou des installations qui identifient les organismes et les lignes directrices taxonomiques ou la méthode utilisée pour confirmer les espèces;
- les antécédents, les conditions de transport et l'âge des masses d'œufs, des têtards ou des grenouilles adultes reproductrices utilisés ayant fourni des organismes d'essai;
- la description des conditions et des modes opératoires d'élevage, y compris la température, l'éclairage, la source et la qualité de l'eau ainsi que les détails sur son renouvellement, le type et la qualité du substrat, la densité de chargement des organismes, les indices de santé,

l'enregistrement des traitements des maladies, l'hibernation, des tentatives de reproduction et les indices de performance; tout mode opératoire et toute condition d'acclimatation (p. ex. température), y compris le taux de changement;

- les modes opératoires des dénombrements, de la manipulation et du transfert des animaux; ceux qui ont servi à déterminer leur mortalité, leur état, leur aspect et leur comportement;
- l'origine et la composition de la nourriture, les méthodes utilisées pour la préparation et la conservation des aliments, les méthodes d'alimentation, la fréquence des repas et les rations données;
- si les organismes d'essai sont importés en vue d'une utilisation immédiate dans les essais : tous les documents fournis par le fournisseur pour chaque expédition, y compris l'espèce, le stade de développement, l'âge et le nombre d'organismes d'essai expédiés, ainsi que la date et l'heure de l'expédition; la température et la concentration en oxygène dissous de l'eau dans les contenants d'expédition au moment de l'expédition et à l'arrivée;
- tout permis requis pour la collecte et l'utilisation des espèces retenues pour l'essai par les autorités régionales, provinciales et/ou fédérales, ainsi que par le Conseil canadien de protection des animaux.

7.2.3 Installations et appareillage expérimentaux

- tous les résultats des essais préliminaires avec l'eau témoin/de dilution et le toxique de référence, entrepris par le laboratoire jusqu'alors inexpérimenté dans la réalisation de la méthode d'essai biologique décrite dans le présent document, préalablement à la communication de tout résultat d'essais définitifs (v. § 3.3);
- la description des systèmes d'éclairage et de la régulation de la température, dans le laboratoire d'essais;
- la description de tout système permettant de fournir de l'air et de réguler le débit d'air transmis aux récipients d'essai;

- la description des modes opératoires du nettoyage ou du rinçage de l'appareillage expérimental.

7.2.4 Eau témoin/de dilution

- les renseignements sur l'échantillonnage et l'entreposage si l'eau réceptrice a été utilisée comme eau témoin/de dilution;
- les renseignements concernant tout *prétraitement* de l'eau (p. ex. filtration, stérilisation, chloration, déchloration, élimination de la chloramine; ajustement du pH, de la température et/ou de la dureté; dégazage, taux et durée d'aération);
- toute variable auxiliaire relative à la qualité de l'eau (p. ex. métaux dissous, ammoniac, pesticides, matières en suspension, chlore résiduel, iodure; v. § 2.3.5) mesurée avant et/ou pendant l'essai de toxicité;
- les conditions (le cas échéant) et la durée d'entreposage avant emploi.

7.2.5 Méthode d'essai

- une description de l'expérience antérieure du laboratoire (p. ex. essais préliminaires, historique des performances des témoins) en ce qui concerne cette méthode d'essai biologique pour mesurer la toxicité à l'aide de *Lithobates pipiens*;
- le mode opératoire employé pour préparer et entreposer les solutions mères et les solutions d'essai de substances chimiques; la description et les concentrations de tout solvant utilisé;
- les méthodes (avec références) utilisées pour les analyses chimiques de l'échantillon ou des solutions d'essai; les 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 des essais préliminaires.

7.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- la photopériode, l'éclairage et les mesures de l'intensité de l'éclairage à la surface du sol dans les récipients d'essai;
- le mode opératoire de l'introduction des organismes dans les récipients d'essai;
- la description de la source de nourriture, du type et de la ration (quantité et fréquence d'alimentation);
- les conditions, les modes opératoires et la fréquence des essais sur des toxiques de référence;
- les analyses chimiques des concentrations du toxique de référence dans la ou les solutions mères et, si elles sont mesurées, dans les solutions d'essai;
- l'aspect de l'échantillon (ou de son mélange d'échantillons) ou de la solution d'essai dans les récipients d'essai; leur évolution observée pendant l'essai;
- des mesures de la qualité de l'eau pour l'approvisionnement en eau utilisée comme eau d'élevage/témoin/de dilution, et pour l'eau des aquariums ou des réservoirs contenant des adultes (v. § 2.3.5 et 2.4.2);
- une description de tout habitat terrestre fourni aux grenouilles adultes;
- la dureté et/ou l'alcalinité totale de l'eau témoin/de dilution et au moins la concentration d'essai la plus élevée au début de l'essai;
- toute autre mesure chimique de l'échantillon, des solutions mères ou des solutions d'essai (p. ex. la concentration chimique, la teneur en matières en suspension, la conductivité, la dureté, l'alcalinité) avant et/ou pendant l'essai.

7.2.7 Résultats

- les résultats d'essais préliminaires;
- les résultats de toute analyse statistique effectuée à la fois avec et sans valeurs aberrantes; pour les besoins des régressions ou l'analyse des effets significatifs, les renseignements sur la taille des échantillons (p. ex. le nombre de répétitions dans chaque variante expérimentale), l'estimation des paramètres et de leur variance, tout tableau d'analyse de variance produit, les graphiques des valeurs ajustées et observées de tout modèle utilisé, les résultats des essais avec valeurs aberrantes, les résultats des essais de normalité et d'homoscédasticité, et les résultats obtenus grâce au programme statistique;
- une carte de contrôle montrant les résultats les plus récents et les antécédents des essais de toxicité de référence ou des concentrations témoins positives au moyen du toxique de référence; le cas échéant, le CV pour les données antérieures moyennes obtenues grâce aux essais de toxicité de référence ou concentrations témoins positives effectués avec le toxique de référence;
- la présentation graphique des données.

Références

- Abernethy S.G., et Westlake G.F. 1989. Guidelines for pH Adjustment of Effluent Samples for Toxicity Testing, ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale, Ontario. 11 p.
- Aldrich A.P. 2009. Sensitivity of Amphibians to Pesticides, *Agrarforschung*, 16(11-12):466-471.
- Allran J.W., et Karasov W.H. 2000. Effects of Atrazine and Nitrate on Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*) Larvae Exposed in the Laboratory from Posthatch Through Metamorphosis, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(11):2850-2855.
- Alworth L.C., et Harvey S.B. 2007. IACUC Issues Associated with Amphibian Research, *ILAR Journal*, 48(3):278-289.
- Amaral D.F.D., Guerra V., Motta A.G.C., e Silva D.M., et Rocha T.L. 2019. Ecotoxicity of Nanomaterials in Amphibians: A Critical Review, *Science of the Total Environment*, 686:332-344.
- Ankley G.T., Kuehl D.W., Kahl M.D., Jensen K.M., Butterworth B.C., et Nichols J.W. 2004. Partial Life-Cycle Toxicity and Bioconcentration Modeling of Perfluorooctanesulfonate in the Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(11):2745-2755.
- APHA, AWWA et WEF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation). 2011. 8930 Amphibians (Proposed), dans : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22^e éd., Rice E.W., Baird R.B., Eaton A.D., et Clesceri L.S. (dir.), Washington, D.C. 10 p.
- APHA, AWWA et WEF. 2017. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23^e éd., Baird R.B., Eaton A.D., et Rice E.W. (dir.), Washington, D.C. 1504 p.
- Araújo C.V.M., Shinn C., Moreira-Santos M., Lopes I., Espíndola E.L.G., et Ribeiro R. 2014. Copper-Driven Avoidance and Mortality in Temperate and Tropical Tadpoles, *Aquatic Toxicology*, 146:70-75.
- ASTM. 2019. Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX), ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvanie, ASTM E1439-12(2019). 16 p.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). 2022a. Standard Guide for Conducting Whole Sediment Toxicity Tests with Amphibians, ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvanie, ASTM E2591-22(2022). 19 p.
- ASTM. 2022b. Standard Guide for Use of Lighting in Laboratory Testing, ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvanie, ASTM E1733-95(2014). 15 p.
- ASTM. 2023a. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Aqueous Ambient Samples and Effluents with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians, ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvanie, ASTM E1192-23(2023). 15 p.
- ASTM. 2023b. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians, ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvanie, ASTM E729-23e1(2023). 23 p.
- AVMA (American Veterinary Medical Association). 2020. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: Édition 2020, AVMA, Schaumburg, Illinois. 121 p.
- Basu N., Crump D., Head J., Hickey G., Hogan N., Maguire S., Xia J., et Hecker M. 2019. EcoToxChip: A Next-Generation Toxicogenomics Tool for Chemical Prioritization and Environmental Management, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(2):279-288.
- Baud D.R., et Beck M.L. 2005. Interactive Effects of UV-B and Copper on Spring Peeper Tadpoles (*Pseudacris crucifer*), *Southeastern Naturalist*, 4(1):15-22.

- Becker C.G., Fonseca C.R., Haddad C.F.B., Batista R., et Prado P.I. 2007. Habitat Split and the Global Decline of Amphibians, *Science*, 318(5857):1775-1777.
- Beebee T.J.C., et Griffiths R.A. 2005. The Amphibian Decline Crisis: A Watershed for Conservation Biology?, *Biological Conservation*, 125(3):271-285.
- Berger L., Speare R., Daszak P., Green D.E., Cunningham A.A., Goggin C.L., Slocombe R., Ragan M.A., Hyatt A.D., McDonald K.R., Hines H.B., Lips K.R., Marantelli G., et Parkes H. 1998. Chytridiomycosis Causes Amphibian Mortality Associated with Population Declines in the Rain Forests of Australia and Central America, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(15):9031-9036.
- Berrill M., Bertram S., McGillivray L., Kolohon M., et Pauli B. 1994. Effects of Low Concentrations of Forest-Use Pesticides on Frog Embryos and Tadpoles, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(4):657-664.
- Berrill M., Bertram S., Wilson A., Louis S., Brigham D., et Stromberg C. 1993. Lethal and Sublethal Impacts of Pyrethroid Insecticides on Amphibian Embryos and Tadpoles, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(3):525-539.
- Berrill M., Coulson D., McGillivray L., et Pauli B. 1998. Toxicity of Endosulfan to Aquatic Stages of Anuran Amphibians, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(9):1738-1744.
- Biga L.M., et Blaustein A.R. 2013. Variations in Lethal and Sublethal Effects of Cypermethrin Among Aquatic Stages and Species of Anuran Amphibians, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(12):2855-2860.
- Birge W.J., Black J.A., et Westerman A.G. 1985. Short-Term Fish and Amphibian Embryo-Larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents: Complex Mixtures, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 4(6):807-821.
- Birge W.J., Westerman A.G., et Spromberg J.A. 2000. Comparative Toxicology and Risk Assessment of Amphibians, dans : *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, Sparling D.W., Linder G., et Bishop C.A. (dir.), SETAC Technical Publication Series, SETAC Press, Pensacola, Floride, p. 727-791.
- Blaustein A.R., et Kiesecker J.M. 2002. Complexity in Conservation: Lessons from the Global Decline of Amphibian Populations, *Ecology Letters*, 5(4):597-608.
- Blaustein A.R., Hoffman P.D., Hokit D.G., Kiesecker J.M., Walls S.C., et Hays J.B. 1994. UV Repair and Resistance to Solar UV-B in Amphibian Eggs: A Link to Population Declines?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(5):1791-1795.
- Blaustein A.R., Kiesecker J.M., Chivers D.P., Hokit D.G., Marco A., Belden L.K., et Hatch A. 1998. Effects of Ultraviolet Radiation on Amphibians Field Experiments, *American Zoologist*, 38(6):799-812.
- Blaustein A.R., Romansic J.M., Kiesecker J.M., et Hatch A.C. 2003. Ultraviolet Radiation, Toxic Chemicals and Amphibian Population Declines, *Diversity and Distributions*, 9(2):123-140.
- Boone M.D., Hammond S.A., Veldhoen N., Youngquist M., et Helbing C.C. 2013. Specific Time of Exposure During Tadpole Development Influences Biological Effects of the Insecticide Carbaryl in Green Frogs (*Lithobates clamitans*), *Aquatic Toxicology*, 130-131:139-148.
- Boone M.D., Semlitsch R.D., Little E.E., et Doyle M.C. 2007. Multiple Stressors in Amphibian Communities: Effects of Chemical Contamination, Bullfrogs, and Fish, *Ecological Applications*, 17(1):291-301.
- Bradfield K. 2010. Managing Water Quality for Amphibians in Captivity, Herpetology Department, Durrell Wildlife Conservation Trust. 28 p.
- Bridges C.M., Dwyer F.J., Hardesty D.K., et Whites D.W. 2002. Comparative Contaminant Toxicity: Are Amphibian Larvae More Sensitive

- Than Fish?, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69:562-569.
- Brinkman S.F., et Johnston W.D. 2012. Acute Toxicity of Zinc to Several Aquatic Species Native to the Rocky Mountains, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62:272-281.
- Brown S.R., Flynn R.W., et Hoverman J.T. 2021. Perfluoroalkyl Substances Increase Susceptibility of Northern Leopard Frog Tadpoles to Trematode Infection, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(3):689-694.
- Browne R.K., et Zippel K. 2007. Reproduction and Larval Rearing of Amphibians, *ILAR Journal*, 48(3):214-234.
- Browne R.K., Odum R.A., Herman T., et Zippel K. 2007. Facility Design and Associated Services for the Study of Amphibians, *ILAR Journal*, 48(3):188-202.
- Brühl C.A., Schmidt T., Pieper S., et Alscher A. 2013. Terrestrial Pesticide Exposure of Amphibians: An Underestimated Cause of Global Decline?, *Nature: Scientific Reports*, 3:1-4.
- Budischak S.A., Belden L.K., et Hopkins W.A. 2009. Relative Toxicity of Malathion to Trematode-Infected and Noninfected *Rana palustris* Tadpoles, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56:123-128.
- Burggren W.W., et Warburton S. 2007. Amphibians as Animal Models for Laboratory Research in Physiology, *ILAR Journal*, 48(3):260-269.
- Burghardt G.M. 2013. Environmental Enrichment and Cognitive Complexity in Reptiles and Amphibians: Concepts, Review, and Implications for Captive Populations, *Applied Animal Behaviour Science*, 147:286-298.
- Cashins S.D., Alford R.A., et Skerratt L.F. 2008. Lethal Effects of Latex, Nitrile, and Vinyl Gloves on Tadpoles, *Herpetological Review*, 39(3):298-301.
- CCCEP (Conseil canadien de conservation des espèces en péril). 2011. Espèces sauvages 2010 : La situation générale des espèces au Canada, Groupe de travail national sur la situation générale, Ottawa, Ontario. 323 p.
- CCME (Conseil canadien des ministres de l'environnement). 1999. Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux : protection de la vie aquatique : composés chlorés réactifs, dans : *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement, 1999*, Conseil canadien des ministres de l'environnement, Winnipeg, Manitoba, publication n°. 1300. 10 p.
- CCME. 2010. Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux visant la protection de la vie aquatique : ammoniac, dans : *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement, 2010*, Conseil canadien des ministres de l'environnement, Winnipeg, Manitoba, publication n°. 1300. 8 p.
- CCMRE (Conseil canadien des ministres des ressources et de l'environnement). 1987. Recommandations canadiennes pour la qualité des eaux, Groupe de travail sur les recommandations relatives à la qualité des eaux, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 1484 p.
- CCPA (Conseil canadien de protection des animaux). 2005. Lignes directrices sur le soin et l'utilisation des poissons en recherche, en enseignement et dans les tests, Sous-comité ad hoc sur les poissons du Comité des lignes directrices, Conseil canadien de protection des animaux, Ottawa, Ontario. 94 p.
- CCPA. 2010. Lignes directrices du CCPA sur : l'euthanasie des animaux utilisés en science, Sous-comité ad hoc sur l'euthanasie du Comité des lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux, Ottawa, Ontario. 36 p.
- CCPA. 2021. Lignes directrices du CCPA : les amphibiens, Conseil canadien de protection des animaux, Ottawa, Ontario. 98 p.
- Che J., Pang J., Zhao H., Wu G.-f., Zhao E.-m., et Zhang Y.-p. 2007. Phylogeny of Raninae (Anura: Ranidae) Inferred from Mitochondrial and Nuclear Sequences, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(1):1-13.
- Chen T.-H., Gross J.A., et Karasov W.H. 2007. Adverse Effects of Chronic Copper Exposure in

- Larval Northern Leopard Frogs (*Rana pipiens*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(7):1470-1475.
- Chen T.-H., Gross J.A., et Karasov W.H. 2009. Chronic Exposure to Pentavalent Arsenic of Larval Leopard Frogs (*Rana pipiens*): Bioaccumulation and Reduced Swimming Performance, *Ecotoxicology*, 18:587-593.
- Coady K.K., Lehman C.M., Currie R.J., et Marino T.A. 2014. Challenges and Approaches to Conducting and Interpreting the Amphibian Metamorphosis Assay and the Fish Short-Term Reproduction Assay, *Birth Defects Research (Part B)*, 101(1):80-89.
- Cohen Jr. M.M. 2001. Frog Decline, Frog Malformations, and a Comparison of Frog and Human Health, *American Journal of Medical Genetics*, 104(2):101-109.
- Collins J.P., et Storfer A. 2003. Global Amphibian Declines: Sorting the Hypotheses, *Diversity and Distributions*, 9(2):89-98.
- Collins J.T., et Taggart T.W. 2009. *Standard Common and Current Scientific Names for North American Amphibians, Turtles, Reptiles, and Crocodylians*, 6^e éd., Center for North American Herpetology, Lawrence, Kansas. 53 p.
- Comité sur les espèces en péril. 2013. Rapport de situation sur la grenouille léopard (*Lithobates pipiens*) dans les Territoires du Nord-Ouest, comité sur les espèces en péril, Yellowknife, les Territoires du Nord-Ouest. 66 p.
- COSEPAC (Comité sur la situation des espèces en péril au Canada). 2009. Évaluation et Rapport de situation du COSEPAC sur la grenouille léopard *Lithobates pipiens*, population des Rocheuses, populations des Prairies et de l'ouest de la zone boréale et populations de l'Est, au Canada, Comité sur la situation des espèces en péril au Canada, Ottawa. 76 p.
- Croteau M.C., Davidson M., Duarte-Guterman P., Wade M., Popesku J.T., Wiens S., Lean D.R.S., et Trudeau V.L. 2009. Assessment of Thyroid System Disruption in *Rana pipiens* Tadpoles Chronically Exposed to UVB Radiation and 4-tert-octylphenol, *Aquatic Toxicology*, 95(2):81-92.
- Crump D., Werry K., Veldhoen N., Van Aggelen G., et Helbing C.C. 2002. Exposure to the Herbicide Acetochlor Alters Thyroid Hormone-Dependent Gene Expression and Metamorphosis in *Xenopus laevis*, *Environmental Health Perspectives*, 110(12):1199-1205.
- Crump D., Hickey G., Boulanger E., Masse A., Head J.A., Hogan N., Maguire S., Xia J., Hecker M., et Basu N.. 2023. Development and Initial Testing of EcoToxChip, a Novel Toxicogenomics Tool for Environmental Management and Chemical Risk Assessment, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(8):1763-1771.
- Deitzer G. 1994. Spectral Comparisons of Sunlight and Different Lamps, dans : *Proceedings of International Lighting in Controlled Environments Workshop*, Tibbitts T.W. (éd.), Madison, Wisconsin, p. 197-199.
- Densmore C.L., et Green D.E. 2007. Diseases of Amphibians, *ILAR Journal*, 48(3):235-254.
- Denton D., Diamond J., et Stuber R. 2019. Comparison of False-Positive Rates of 2 Hypothesis-Test Approaches in Relation to Laboratory Toxicity Test Performance, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38:511-523.
- Denton D., Diamond J., et Zheng L. 2011. Test of Significant Toxicity: A Statistical Application for Assessing Whether an Effluent or Site Water is Truly Toxic, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30:1117-1126.
- Dewey T. 1999. *Lithobates pipiens* (Northern Leopard Frog), in Animal Diversity Web. URL : https://animaldiversity.org/accounts/Lithobates_pipiens/. Consulté le 8 décembre 2020.
- Dodd Jr. C.K. 2013. *Lithobates pipiens* (Schreber, 1782), Northern Leopard Frog/Grenouille léopard, dans : *Frogs of the United States and Canada Vol. 1.*, Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, p. 578-608.
- Doe K., Jackman P., et Pauli B.D. 2012. Acute Toxicity of Thirty Four Pesticide Formulations to Amphibians, Fish, Invertebrates, Bacteria, and Algae, and a Comparative Analysis of Their

- Relative Sensitivity, Environnement Canada, Moncton, Nouveau-Brunswick. 149 p.
- Earl J.E., et Whiteman H.H. 2009. Effects of Pulsed Nitrate Exposure on Amphibian Development, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(6):1331-1337.
- Earl J.E., et Whiteman H.H. 2010. Evaluation of Phosphate Toxicity in Cope's Gray Treefrog (*Hyla chrysoscelis*) Tadpoles, *Journal of Herpetology*, 44(2):201-208.
- EC (Environnement Canada). 1990. Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence, Environnement Canada, Ottawa, Ontario, rapport SPE 1/RM/12. 95 p.
- EC. 1994. Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques, Environnement Canada, Ottawa, Ontario, rapport SPE 1/RM/29. 170 p.
- EC. 1998. Méthode d'essai biologique : essais toxicologiques sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique, 2^e éd., Environnement Canada, Ottawa, Ontario, rapport SPE 1/RM/28. 122 p.
- EC. 1999. Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats, Environnement Canada, Ottawa, Ontario, rapport SPE 1/RM/34. 226 p.
- EC. 2005. Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité, Environnement Canada, Ottawa, Ontario, rapport SPE 1/RM/46 avec les modifications de juin 2007. 283 p.
- EC. 2007. Méthode d'essai biologique : Essai de reproduction et de survie du cladocère *Ceriodaphnia dubia*, 2^e éd., Environnement Canada, Ottawa, Ontario, rapport SPE 1/RM/21. 100 p.
- EC. 2011. Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule, 2^e éd., Environnement Canada, Ottawa, Ontario, rapport SPE 1/RM/22. 100 p.
- EC. 2013a. Méthode d'essai biologique : essai de croissance de plantes terrestres indigènes de la région boréale exposées à un sol contaminé, Environnement Canada, Ottawa, Ontario, rapport SPE 1/RM/56. 137 p.
- EC. 2013b. Plans de gestion de la grenouille léopard (*Lithobates pipiens*), Populations des Prairies et de l'ouest de la zone boréale au Canada, Loi sur les espèces en péril, Série de Plans de gestion, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 33 p.
- EC. 2014. Méthode d'essai biologique servant à mesurer la survie de collemboles exposés à des contaminants dans le sol, 2^e éd., Environnement Canada, Ottawa, Ontario, rapport SPE 1/RM/47. 184 p.
- EC. 2017. Méthode d'essai biologique : essai de survie, de croissance et de reproduction de l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca* dans les sédiments et l'eau, 3^e éd., Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa, Ontario, rapport SPE 1/RM/33. 203 p.
- ECCC (Environnement et Changement climatique Canada). 2020. Méthode d'essai biologique : essai de mesure de la reproduction des acariens oribates exposés à des contaminants dans le sol, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa, Ontario, rapport DGST 1/RM/61. 135 p.
- ECCC. 2022. Méthode d'essai biologique : essais pour déterminer la réaction d'évitement ou la reproduction des vers de terre (*Eisenia andrei* ou *Dendrodrilus rubidus*) exposés à des contaminants dans le sol, 2^e éd., Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa, Ontario, rapport DGST 1/RM/43. 180 p.
- ECCC. 2023. Rapport technique sur les grenouilles léopards (*Lithobates pipiens*), rapport préparé par Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa, Ontario. 19 p.
- Edgington A.N. 2001. Review of Amphibian Culturing and Toxicity Testing Procedures, rapport préparé pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 70 p.
- Edgington A.N., Sheridan P.M., Stephenson G.R., Thompson D.G., et Boermans H. 2004.

- Comparative Effects of pH and Vision® Herbicide on Two Life Stages of Four Anuran Amphibian Species, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4):815-822.
- Edginton A.N., Stephenson G.R., Sheridan P.M., Thompson D.G., et Boermans H.J. 2003. Effect of pH and Release® on Two Life Stages of Four Anuran Amphibians, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(11):2673-2678.
- EFSA PPR Panel (Le groupe scientifique de l'EFSA sur les produits phytopharmaceutiques et leurs résidus), Ockleford C., Adriaanse P., Berny P., Brock T., Duquesne S., Grilli S., Hernandez-Jerez A.F., Bennekou S.H., Klein M., Kuhl T., Laskowski R., Machera K., Pelkonen O., Pieper S., Stemmer M., Sundh I., Teodorovic I., Tiktak A., Topping C.J., Wolterink G., Aldrich A., Berg C., Ortiz-Santaliestra M., Weir S., Streissl F., et Smith R.H., 2018. Scientific Opinion on the State of the Science on Pesticide Risk Assessment for Amphibians and Reptiles, *EFSA Journal*, 16(2):5125. 301 p.
- Egea-Serrano A., Relyea R.A., Tejedo M., et Torralva M. 2012. Understanding of the Impact of Chemicals on Amphibians: A Meta-Analytic Review, *Ecology and Evolution*, 2(7):1382-1397.
- ENSR International. 2004. Development of a Standardized Approach for Assessing Potential Risks to Amphibians Exposed to Sediment and Hydric Soils, Technical Report TR-2245-ENV, rapport préparé pour Naval Facilities Engineering Command (NAVFAC), Port Hueneme, Californie. 340 p.
- Experimental Pathology Laboratories Inc. 2019. Histology and Pathology of Northern Leopard Frogs Exposed to Thyroxine: Pathology Report, rapport préparé pour Environnement et Changement climatique Canada, 14 p.
- Ferrie G.M., Alford V.C., Atkinson J., Baitchman E., Barber D., Blaner W.S., Crawshaw G., Daneault A., Dierenfeld E., Finke M., Fleming G., Gagliardo R., Hoffman E.A., Karasov W., Klasing K., Koutsos E., Lankton J., Lavin S.R., Lentini A., Livingston S., Lock B., Mason T., McComb A., Morris C., Pessier A.P., Olea-Popelka F., Probst T., Rodriguez C., Schad K., Semmen K., Sincage J., Stamper M.A., Steinmetz J., Sullivan K., Terrell S., Wertan N., Wheaton C.J., Wilson B., et Valdes E.V. 2014. Nutrition and Health in Amphibian Husbandry, *Zoo Biology*, 33(6):485-501.
- Fort Environmental Laboratories Inc. 2018. Évaluation des têtards de grenouilles léopards, rapport préparé pour Environnement et Changement climatique Canada, 10 p.
- Forzán M.J., Vanderstichel R., Hogan N.S., Teather K., et Wood J. 2010. Prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Three Species of Wild Frogs de Île-du-Prince-Édouard, Canada, *Diseases of Aquatic Organisms*, 91:91-96.
- Fraker S.L., et Smith G.R. 2004. Direct and Interactive Effects of Ecologically Relevant Concentrations of Organic Wastewater Contaminants on *Rana pipiens* Tadpoles, *Environmental Toxicology*, 19(3):250-256.
- Freda J. 1986. The Influence of Acidic Pond Water on Amphibians: A Review, *Water, Air, and Soil Pollution*, 30:439-450.
- Freda J., et McDonald D.G. 1990. Effects of Aluminum on the Leopard Frog, *Rana pipiens*: Life Stage Comparisons and Aluminum Uptake, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47:210-216.
- Fridgen C.M. 2009. Laboratory Controlled Normal and Atrazine Exposed Development of Northern Leopard Frog, *Rana pipiens* Tadpoles. Master's thesis - Trent University, Peterborough, Ontario. 126 p.
- Fridgen C.M., Hogan N.S., Trudeau V.L., Berrill M., Doe K., et Pauli B.D. 2007. Developmental Profiles of the Northern Leopard Frog: Are There Sensitive Periods for Disruption of the Thyroid and Reproductive Axis?, SETAC - 17^e réunion annuelle européenne, Porto, Portugal.
- Fridgen C.M., Xenopoulos M., et Metcalfe C. 2009. TiO₂ Nanoparticles Increase the Toxicity of Roundup WeatherMax® in Exposed Frog Tadpoles, SETAC- 30^e réunion annuelle nord-américaine, La Nouvelle-Orléans, Louisiane.

- Frost D.R., Grant T., Faivovich J., Bain R.H., Haas A., Haddad C.F.B., de Sá R.O., Channing A., Wilkinson M., Donnellan S.C., Raxworthy C.J., Campbell J.A., Blotto B.L., Moler P.E., Drewes R.C., Nussbaum R.A., Lynch J.D., Green D.M., et Wheeler W. 2006. The Amphibian Tree of Life, *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 297:1-291.
- Frost D.R., Moriarty Lemmon E., McDiarmid R.W., et Mendelson J.R. III. 2017. Anura – Frogs, dans : *Scientific and Standard English Names of Amphibians and Reptiles of North America North of Mexico, with Comments Regarding Confidence in Our Understanding*, 8^e éd., B.I. Crother (éd.), Society for the Study of Amphibians and Reptiles, SSAR Herpetological Circular N^o. 43, p. 6-24.
- Gavel M.J., Young S.D., Blais N., Forbes M.R., et Robinson S.A. 2021. Trematodes Coupled with Neonicotinoids: Effects on Blood Cell Profiles of a Model Amphibian, *Parasitology Research*, 120(6):2135-2148.
- Gentz E.J. 2007. Medicine and Surgery of Amphibians, *ILAR Journal*, 48(3):255-259.
- Glaberman S., Kiwiet J., et Aubee C.B. 2019. Evaluating the Role of Fish as Surrogates for Amphibians in Pesticide Ecological Risk Assessment, *Chemosphere*, 235:952-958.
- Glennemeier K.A., et Denver R.J. 2002. Role for Corticoids in Mediating the Response of *Rana pipiens* Tadpoles to Intraspecific Competition, *Journal of Experimental Zoology*, 292(1):32-40.
- Gosner K.L. 1960. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification, *Herpetologica*, 16(3):183-190.
- Goulet B.N., et Hontela A. 2003. Toxicity of Cadmium, Endosulfan, and Atrazine in Adrenal Steroidogenic Cells of Two Amphibian Species, *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(9):2106-2113.
- Green J., et Wheeler J.R. 2013. The Use of Carrier Solvents in Regulatory Aquatic Toxicology Testing: Practical, Statistical and Regulatory Considerations, *Aquatic Toxicology*, 144-145:242-249.
- Green J.W., Springer T.A., et Holbech H. 2018. *Statistical Analysis of Ecotoxicity Studies*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey. 390 p.
- Greer A.L., Schock D.M., Brunner J.L., Johnson R.A., Picco A.M., Cashins S.D., Alford R.A., Skerratt L.F., et Collins J.P. 2009. Guidelines for the Safe Use of Disposable Gloves with Amphibian Larvae in Light of Pathogens and Possible Toxic Effects, *Herpetological Review*, 40(2):145-147.
- Greulich K., et Pflugmacher S. 2004. Uptake and Effects on Detoxication Enzymes of Cypermethrin in Embryos and Tadpoles of Amphibians, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(4):489-495.
- Gromko M.H., Mason F.S., et Smith-Gill S.J. 1973. Analysis of the Crowding Effect in *Rana pipiens* Tadpoles, *Journal of Experimental Zoology*, 186(1):63-71.
- Gross J.A., Johnson P.T.J., Prah L.K., et Karasov W.H. 2009. Critical Period of Sensitivity for Effects of Cadmium on Frog Growth and Development, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(6):1227-1232.
- Gunderson M.P., Veldhoen N., Skirrow R.C., Macnab M.K., Ding W., van Aggelen G., et Helbing C.C. 2011. Effect of Low Dose Exposure to the Herbicide Atrazine and its Metabolite on Cytochrome P450 Aromatase and Steroidogenic Factor-1 mRNA Levels in the Brain of Premetamorphic Bullfrog Tadpoles (*Rana catesbeiana*), *Aquatic Toxicology*, 102(1-2):31-38.
- Gutleb A.C., Bronkhorst M., van den Berg J.H.J., et Murk A.J. 2001. Latex Laboratory-Gloves: An Unexpected Pitfall in Amphibian Toxicity Assays with Tadpoles, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10(3):119-121.
- Halder M., Kienzler A., Whelan M., et Worth A. 2014. EURL ECVAM Strategy to Replace, Reduce and Refine the Use of Fish in Aquatic Toxicity and Bioaccumulation Testing, Centre commun de recherche et de rapports d'orientation, Union européenne, Luxembourg, rapport EUR 26973. 34 p.

- Haramura T. 2016. Hatching Plasticity in Response to Salinity Levels in a Rhacophorid Frog Inhabiting a Coastal Area, *Journal of Zoology*, 299(2):125-131.
- Hayes T.B., Falso P., Gallipeau S., et Stice M. 2010. The Cause of Global Amphibian Declines: A Developmental Endocrinologist's Perspective, *Journal of Experimental Biology*, 213(6):921-933.
- Heerema J.L., Jackman K.W., Miliano R.C., Li L., Zaborniak T.S.M., Veldhoen N., van Aggelen G., Parker W.J., Pyle G.G., et Helbing C.C. 2018. Behavioral and Molecular Analyses of Olfaction-Mediated Avoidance Responses of *Rana (Lithobates) catesbeiana* Tadpoles: Sensitivity to Thyroid Hormones, Estrogen, and Treated Municipal Wastewater Effluent, *Hormones and Behavior*, 101:85-93.
- Hersikorn B.D., et Smits J.E.G. 2011. Compromised Metamorphosis and Thyroid Hormone Changes in Wood Frogs (*Lithobates sylvaticus*) Raised on Reclaimed Wetlands on the Athabasca Oil Sands, *Environmental Pollution*, 159(2):596-601.
- Higley E., Tompsett A.R., Giesy J.P., Hecker M., et Wiseman S. 2013. Effects of Triphenyltin on Growth and Development of the Wood Frog (*Lithobates sylvaticus*), *Aquatic Toxicology*, 144-145:155-161.
- Hillis D.M. 2007. Constraints in Naming Parts of the Tree of Life, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(2):331-338.
- Hinther A., Domanski D., Vawda S., et Helbing C.C. 2010a. C-Fin: A Cultured Frog Tadpole Tail Fin Biopsy Approach for Detection of Thyroid Hormone-Disrupting Chemicals, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(2):380-388.
- Hinther A., Vawda S., Skirrow R.C., Veldhoen N., Collins P., Cullen J.T., van Aggelen G., et Helbing C.C. 2010b. Nanometals Induce Stress and Alter Thyroid Hormone Action in Amphibia at or Below North American Water Quality Guidelines, *Environmental Science and Technology*, 44(21):8314-8321.
- Hoening J.M., et Heisey D.M. 2001. The Abuse of Power: The Pervasive Fallacy of Power Calculations for Data Analysis, *The American Statistician*, 55:19-24.
- Hoffman E.A., et Blouin M.S. 2004. Evolutionary History of the Northern Leopard Frog: Reconstruction of Phylogeny, Phylogeography, and Historical Changes in Population Demography from Mitochondrial DNA, *Evolution*, 58(1):145-159.
- Hogan N., Duarte P., Wade M.G., Lean D.R.S., et Trudeau V.L. 2008. Estrogenic Exposure Affects Metamorphosis and Alters Sex Ratios in the Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*): Identifying Critically Vulnerable Periods of Development, *General and Comparative Endocrinology*, 156:515-523.
- Holloway A.C., Keene J.L., Noakes D.G., et Moccia R.D. 2004. Effects of Clove Oil and MS-222 on Blood Hormone Profiles in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*, *Walbaum, Aquaculture Research*, 35(11):1025-1030.
- Hoover G.M., Chislock M.F., Tornabene B.J., Guffey S.C., Choi Y.J., De Perre C., Hoverman J.T., Lee L.S., et Sepulveda M.S. 2017. Uptake and Depuration of Four Per/Polyfluoroalkyl Substances (PFASS) in Northern Leopard Frog *Rana pipiens* Tadpoles, *Environmental Science and Technology Letters*, 4(10):399-403.
- Hopkins W.A. 2007. Amphibians as Models for Studying Environmental Change, *ILAR Journal*, 48(3):270-277.
- Horne M.T., et Dunson W.A. 1995. Effects of Low pH, Metals, and Water Hardness on Larval Amphibians, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29:500-505.
- Houlahan J.E., Findlay C.S., Schmidt B.R., Meyer A.H., et Kuzmin S.L. 2000. Quantitative Evidence for Global Amphibian Population Declines, *Nature*, 404(6779):752-755.
- Howe C.M., Berrill M., Pauli B.D., Helbing C.C., Werry K., et Veldhoen N. 2004. Toxicity of Glyphosate-Based Pesticides to Four North American Frog Species, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(8):1928-1938.

- Hutchinson T.H., Shillabeer N., Winter M.J., et Pickford D.B. 2006. Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review, *Aquatic Toxicology*, 76:69-92.
- ICAMA (Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture). 2014. Test Guidelines on Environmental Safety Assessment for Chemical Pesticides - Part 18: Amphibian Acute Toxicity Test, GB/T 31270.18-2014, Hangzhou, Chine. 13 p.
- ISO (Organisation internationale de normalisation). 2006. Qualité de l'eau - Évaluation de la génotoxicité par le mesurage de l'induction de micronoyaux - Partie 1 : Évaluation de la génotoxicité à l'aide de larves d'amphibiens, Genève, Suisse, ISO 21427-1:2006. 15 p.
- ISO. 2017. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais, Genève, Suisse, ISO/IEC 17025:2017. 38 p.
- ISO. 2019. Qualité du sol - Identification des espèces par codes-barres ADN dans les essais d'écotoxicologie, Genève, Suisse, ISO 21286:2019. 28 p.
- Jackman K.W., Veldhoen N., Miliano R.C., Robert B.J., Li L., Khojasteh A., Zheng X., Zaborniak T.S.M., van Aggelen G., Lesperance M., Parker W.J., Hall E.R., Pyle G.G., et Helbing C.C. 2018. Transcriptomics Investigation of Thyroid Hormone Disruption in the Olfactory System of the *Rana* [*Lithobates*] *catesbeiana* Tadpole, *Aquatic Toxicology*, 202:46-56.
- Jackman P., Doe K., Pauli B., et Scroggins R. 2007. The Development of a Standardized Acute Toxicity Test with the Leopard Frog (*Rana pipiens*) and Comparison of the Results with Standard Test Species. Atelier sur la toxicité aquatique - 34^e rencontre annuelle, Halifax, Nouvelle-Écosse.
- Jofre M.B., et Karasov W.H. 1999. Direct Effect of Ammonia on Three Species of North American Anuran Amphibians, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(8):1806-1812.
- John W. Green Ecostatistical Consulting LLC. 2021. Comparison of Three Models for Statistical Analysis of Amphibian Developmental Stage, rapport préparé pour l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa, Ontario. 172 p.
- Johnson M.J., Aubee C., Salice C.J., Leigh K., Liu E., Pott U., et Pillard D. 2017. A Review of Ecological Risk Assessment Methods of Amphibians: Comparative Assessment of testing Methodologies and Available Data. Integrated Environmental Assessment and Management, Volume 13, Numéro 4, p. 601-613.
- Johnson M.L., Berger L., Philips L., et Speare R. 2003. Fungicidal Effects of Chemical Disinfectants, UV Light, Desiccation and Heat on the Amphibian Chytrid, *Batrachochytrium dendrobatidis*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 57(3):255-260.
- Jones D.K., Hammond J.I., et Relyea R.A. 2009. Very Highly Toxic Effects of Endosulfan Across Nine Species of Tadpoles: Lag Effects and Family-Level Sensitivity, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9):1939-1945.
- Karraker N.E., Gibbs J.P., et Vonesh J.R. 2008. Impacts of Road Deicing Salt on the Demography of Vernal Pool-Breeding Amphibians, *Ecological Applications*, 18(3):724-734.
- Kendall K. 2002. Survey Protocol for the Northern Leopard Frog, Alberta Sustainable Resource Development, Fish and Wildlife Division, Edmonton, Alberta, Rapport sur les espèces en péril en Alberta N°. 43. 42 p.
- Kerby J.L., Richards-Hrdlicka K.L., Storfer A., et Skelly D.K. 2010. An Examination of Amphibian Sensitivity to Environmental Contaminants: Are Amphibians Poor Canaries?, *Ecology Letters*, 13(1):60-67.
- Kouba A., Vance C., Calatayud N., Rowlison T., Langhorne C., et Willard S. 2012. Assisted Reproductive Technologies (ART) for Amphibians, dans : *Amphibian Husbandry Resource Guide, édition 2.0*, Poole V.A., et Grow S. (dir.), Association of Zoos et Aquariums, Silver Spring, Maryland, p. 60-118.

- Kuppert S. 2013. Providing Enrichment in Captive Amphibians and Reptiles: Is it Important to Know Their Communication?, *Smithsonian Herpetological Information Service*, 142:1-42.
- Lacoul P., Freedman B., et Clair T. 2011. Effects of Acidification on Aquatic Biota in Atlantic Canada, *Environmental Reviews*, 19:429-460.
- Landis W.G., et Chapman P.M. 2011. Well Past Time to Stop Using NOELs and LOELs, *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7(4):vi-viii.
- Leduc J., Echaubard P., Trudeau V., et Lesbarrères D. 2016. Copper and Nickel Effects on Survival and Growth of Northern Leopard Frog (*Lithobates pipiens*) Tadpoles in Field-Collected Smelting Effluent Water, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(3):687-694.
- LEE A. (Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique). 2004. Progress Report on Leopard Frog Culturing and Test Method Development, rapport préparé pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 19 p.
- LEE A. 2006. Progress Report on Culturing and Test Method Development of *Rana pipiens* (Leopard Frogs), rapport préparé pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 29 p.
- LEE A. 2009. Progress Report on Culturing and Test Method Development of Amphibians at the Atlantic Laboratory for Environmental Testing Up to Fiscal Year 2008-9, rapport préparé pour l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 46 p.
- LEE A. 2013. Progress Report on Culturing and Breeding Amphibians at the Atlantic Laboratory for Environmental for Fiscal Year 2012-13, rapport préparé pour l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 10 p.
- LEE A. 2015. *Lithobates pipiens* Ammonia Toxicity Test Results, rapport préparé pour l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 12 p.
- LEE A. 2016a. *Lithobates pipiens* 21-Day Chronic Feeding Study, rapport préparé pour l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa, Ontario. 22 p.
- LEE A. 2016b. *Lithobates pipiens* 21-Day Chronic Sodium Chloride Toxicity Test Results, rapport préparé pour l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa, Ontario. 29 p.
- LEE A. 2018. Review of Amphibian Culturing Progress at ALET 2017-18, rapport préparé pour l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa, Ontario. 9 p.
- Lenth R.V. 2007. Statistical Power Calculations, *Journal of Animal Science*, 85(Suppl. E.):E24-E29.
- Longcore J.R., Longcore J.E., Pessier A.P., et Halteman W.A. 2007. Chytridiomycosis Widespread in Anurans of Northeastern United States, *Journal of Wildlife Management*, 71(2):435-444.
- Lutz I., Kloas W., Springer T.A., Holden L.R., Wolf J.C., Krueger H.O., et Hosmer A.J. 2008. Development, Standardization and Refinement of Procedures for Evaluating Effects of Endocrine Active Compounds on Development and Sexual Differentiation of *Xenopus laevis*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(8):2031-2048.
- Mackenzie C.A., Berrill M., Metcalfe C., et Pauli B.D. 2003. Gonadal Differentiation in Frogs Exposed to Estrogenic and Antiestrogenic Compounds, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(10):2466-2475.
- Mann R.M., Bidwell J.R., et Tyler M.J. 2003. Toxicity of Herbicide Formulations to Frogs and the Implications for Product Registration: A Case Study from Western Australia, *Applied Herpetology*, 1(1-2):13-22.
- Mann R.M., Hyne R.V., Choung C.B., et Wilson S.P. 2009. Amphibians and Agricultural Chemicals: Review of the Risks in a Complex

- Environment, *Environmental Pollution*, 157(11):2903-2927.
- Marco A., et Blaustein A.R. 1999. The Effects of Nitrite on Behavior and Metamorphosis in Cascades Frogs (*Rana cascadae*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(5):946-949.
- Marlatt V.L., Veldhoen N., Lo B.P., Bakker D., Rehaume V., Vallée K., Haberl M., Shang D., van Aggelen G.C., Skirrow R.C., Elphick J.R., et Helbing C.C. 2013. Triclosan Exposure Alters Postembryonic Development in a Pacific Tree Frog (*Pseudacris regilla*) Amphibian Metamorphosis Assay (TREEMA), *Aquatic Toxicology*, 126:85-94.
- Marquis O., Millery A., Guittonneau S., Miaud C. 2006. Solvent toxicity to amphibian embryos and larvae, *Chemosphere*, 63(5):889-892.
- Martini F., Tarazona J.V., et Pablos M.V. 2012. Are Fish and Standardized FETAX Assays Protective Enough for Amphibians? A Case Study on *Xenopus laevis* Larvae Assay with Biologically Active Substances Present in Livestock Wastes, *The Scientific World Journal*, 2012:605804.
- Martinko C., et Van der Vliet L. 2021. Incorporating the 3Rs Into the Development of a Standardized Test Method Using a Native Amphibian Species, SETAC North America - 42^e rencontre annuel, Portland, Oregon.
- Mattison C. 1993. *Keeping and Breeding Amphibians: Caecilians, Newts, Salamanders, Frogs and Toads*. Blandford Publishing, Londres, Angleterre. 224 p.
- McCallum M.L. 2007. Amphibian Decline or Extinction? Current Declines Dwarf Background Extinction Rate, *Journal of Herpetology*, 41(3):483-491.
- McDaniel T.V., Martin P.A., Ross N., Brown S., Lesage S., et Pauli B.D. 2004. Effects of Chlorinated Solvents on Four Species of North American Amphibians, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(1):101-109.
- McDiarmid R.W., et Altig R. 1999. *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*, University of Chicago Press, Chicago, Illinois. 458 p.
- Melvin S.D., et Houlahan J.E. 2012. Tadpole Mortality Varies Across Experimental Venues: Do Laboratory Populations Predict Responses in Nature?, *Oecologia*, 169(4):861-868.
- Melvin S.D., et Trudeau V.L. 2012a. Growth, Development and Incidence of Deformities in Amphibian Larvae Exposed as Embryos to Naphthenic Acid Concentrations Detected in the Canadian Oil Sands Region, *Environmental Pollution*, 167:178-183.
- Melvin S.D., et Trudeau V.L. 2012b. Toxicity of Naphthenic Acids to Wood Frog Tadpoles (*Lithobates sylvaticus*), *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75(3):170-173.
- Melvin S.D., Habener L.J., Leusch F.D.L., et Carroll A.R. 2017. ¹H NMR-Based Metabolomics Reveals Sub-Lethal Toxicity of a Mixture of Diabetic and Lipid-Regulating Pharmaceuticals on Amphibian Larvae, *Aquatic Toxicology*, 184:123-132.
- Melvin S.D., Lanctôt C.M., Craig P.M., Moon T.W., Peru K.M., Headley J.V., et Trudeau V.L. 2013. Effects of Naphthenic Acid Exposure on Development and Liver Metabolic Processes in Anuran Tadpoles, *Environmental Pollution*, 177:22-27.
- Michaels C.J., Downie J.R., et Campbell-Palmer R. 2014. The Importance of Enrichment for Advancing Amphibian Welfare and Conservation Goals: A Review of a Neglected Topic, *Amphibian & Reptile Conservation (General Section)*, 8(1):7-23.
- Milotic D., Milotic M., et Koprivnikar J. 2017. Effects of Road Salt on Larval Amphibian Susceptibility to Parasitism Through Behavior and Immunocompetence, *Aquatic Toxicology*, 189:42-49.
- Milotic M., Milotic D., et Koprivnikar J. 2018. Exposure to a Cyanobacterial Toxin Increases Larval Amphibian Susceptibility to Parasitism, *Parasitology Research*, 117(2):513-520.
- Mizell S. 1964. Seasonal Differences in Spermatogenesis and Oogenesis in *Rana pipiens*, *Nature*, 202:875-876.

- Morgan K.N., et Tromborg C.T. (2007) Sources of Stress in Captivity, *Applied Animal Behaviour Science*, 102(3-4):262-302.
- Mouchet F., Landois P., Datsyuk V., Puech P., Pinelli E., Flahaut E., et Gauthier L. 2011. International Amphibian Micronucleus Standardized Procedure (ISO 21427-1) for *In Vivo* Evaluation of Double-Walled Carbon Nanotubes Toxicity and Genotoxicity in Water, *Environmental Toxicology*, 26(2):136-145.
- Nautilus Environmental. 2014. Amphibian Test Method Development: Review and Recommendations, rapport préparé pour l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 95 p.
- Nautilus Environmental. 2016. Amphibian Test Method Development: Fall 2015-Spring 2016, rapport préparé pour l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 42 p.
- Nautilus Environmental. 2020a. Amphibian Test Method Development using *Lithobates pipiens*: Inter-Laboratory Study: Round 1 and 2, rapport préparé pour l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa, Ontario. 91 p.
- Nautilus Environmental. 2020b. Amphibian Test Method Development using *Lithobates pipiens*: Inter-Laboratory Study: Round 3, rapport préparé pour l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa, Ontario. 180 p.
- Navarro-Martín L., Lanctôt C., Jackman P., Park B.J., Doe K., Pauli B.D., et Trudeau V.L. 2014. Effects of Glyphosate-Based Herbicides on Survival, Development, Growth and Sex Ratios of Wood Frogs (*Lithobates sylvaticus*) Tadpoles. I: Chronic Laboratory Exposures to VisionMax®, *Aquatic Toxicology*, 154:278-290.
- NERI (National Environmental Research Institute). 1993. Manual of SECOFASE - Development, Improvement and Standardization of a Test System for Assessing Sublethal Effects on Chemicals on Fauna in the Soil Ecosystem, rapport d'un atelier qui s'est tenu à Silkeborg les 18-19 janvier 1993, Silkeborg, Danemark. 41 p.
- Newman M.C. 2008. "What Exactly are You Inferring?" A Closer Look at Hypothesis Testing, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27:1013-1019.
- Nolan M.W., et Smith S.A. 2007. Amphibian Resources on the Internet, *ILAR Journal*, 48(3):290-296.
- Norberg-King T.J. 1993. A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: The Inhibition Concentration (ICp) Approach (Version 2.0), National Effluent Toxicity Assessment Center, Environmental Research Laboratory, Duluth, Minnesota, Technical Report 03-93. 25 p.
- Norberg-King T.J., Embry M.R., Belanger S.E., Braunbeck T., Butler J.D., Dorn P.B., Farr B., Guiney P.D., Hughes S.A., Jeffries M., Journal R., Léonard M., McMaster M., Oris J.T., Ryder K., Segner H., Senac T., Van Der Kraak G., Whale G., et Wilson P. 2018. An International Perspective on the Tools and Concepts for Effluent Toxicity Assessments in the Context of Animal Alternatives: Reduction in Vertebrate Use, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(11):2745-2757.
- O'Donnell R.P., Drost C.A., et Mock K.E. 2017. Cryptic Invasion of Northern Leopard Frogs (*Rana pipiens*) Across Phylogeographic Boundaries and a Dilemma for Conservation of a Declining Amphibian, *Biological Invasions*, 19:1039-1052.
- O'Donnell R.P., et Mock K.E. 2012. Two Frog Species or One? A Multi-Marker Approach to Assessing the Distinctiveness of Genetic Lineages in the Northern Leopard Frog, *Rana pipiens*, *Conservation Genetics*, 13(5):1167-1182.
- OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). 2007. Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology, Series on Testing and Assessment, n°. 82, Éditions OCDE, Paris, France. 77 p.
- OCDE. 2009. Guideline for the Testing of Chemicals, The Amphibian Metamorphosis Assay, n° 231, Éditions OCDE, Paris, France. 33 p.

- OCDE. 2019. Guidance Document on Aqueous-Phase Aquatic Toxicity Testing of Difficult Test Chemicals, 2^e édition, Series on Testing and Assessment, n° 23, Éditions OCDE, Paris, France. 81 p.
- Odum R.A., et Zippel K. 2011. *Water Quality*, Amphibian Ark. 30 p.
- Odum R.A., et Zippel K.C. 2008. Amphibian Water Quality: Approaches to an Essential Environmental Parameter, *International Zoo Yearbook*, 42(1):40-52.
- Ontario Nature. 2016. Northern Leopard Frog (*Lithobates pipiens*). URL : <https://ontarionature.org/programs/community-science/reptile-amphibian-atlas/northern-leopard-frog/>. Consulté le 19 juillet 2021.
- Ortiz-Santaliestra M.E., et Brühl C.A. 2014. Identification of Endpoints Useful to Characterize the Impact of Pesticides on Amphibian Aquatic Stages, SETAC – 24^e rencontre annuelle européenne, Bâle, Suisse.
- Ortiz-Santaliestra M.E., Maia J.P., Egea-Serrano A., Brühl C.A., et Lopes I. 2017. Biological Relevance of the Magnitude of Effects (Considering Mortality, Sub-Lethal and Reproductive Effects) Observed in Studies with Amphibians and Reptiles in View of Population Level Impacts on Amphibians and Reptiles, des publications connexes de l'EFSA, 14(7):1251E. 151 p.
- Ortiz-Santaliestra M.E., Maia J.P., Egea-Serrano A., et Lopes I. 2018. Validity of Fish, Birds and Mammals as Surrogates for Amphibians and Reptiles in Pesticide Toxicity Assessment, *Ecotoxicology*, 27(7):819-833.
- Orton F., Carr J.A., et Handy R.D. 2006. Effects of Nitrate and Atrazine on Larval Development and Sexual Differentiation in the Northern Leopard Frog *Rana pipiens*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(1):65-71.
- Paden N.E., Smith E.E., Maul J.D., et Kendall R.J. 2011. Effects of Chronic 2,4,6-Trinitrotoluene, 2,4-Dinitrotoluene, and 2,6-Dinitrotoluene Exposure on Developing Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Tadpoles, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4):924-928.
- PASCF (Plan d'action pour les sites contaminés fédéraux). 2010. Document d'orientation sur l'évaluation du risque écotoxicologique – Module 1 : Sélection et interprétation des essais de toxicité, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa, Ontario. 85 p.
- PASCF. 2019. Document d'orientation sur l'évaluation du risque écotoxicologique – Module 6 : évaluation des risques écotoxicologiques pour les amphibiens sur les sites contaminés fédéraux, Version 1.0, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa, Ontario. 145 p.
- Pauli B.D., Perrault J.A., et Money S.L. 2000. *RATL : A Database of Reptile and Amphibian Toxicology Literature*, Environnement Canada, Hull, Québec, Service canadien de la faune, Séries de Rapport techniques Numéro 357. 494 p.
- Pauly G.B., Hillis D.M., et Cannatella D.C. 2009. Taxonomic Freedom and the Role of Official Lists of Species Names, *Herpetologica*, 65(2):115-128.
- Pillard D.A., Eck W.S., Johnson M.S., et Packard S. 2017. Effects of 3-Nitro-1,2,4-triazol-5-one on Survival, Growth and Metamorphosis in the Northern Leopard Frog, *Lithobates pipiens*, *Ecotoxicology*, 26(9):1170-1180.
- Plan d'action pour la conservation des prairies de la Saskatchewan. 2018. Guide to Managing for Optimal Habitat Attributes : Northern Leopard Frog (*Lithobates pipiens* – populations des Prairies et de l'ouest de la zone boréale). 33 p.
- Poole V.A., et Grow S. (dir.). 2012. *Amphibian Husbandry Resource Guide, édition 2.0*, Association of Zoos et Aquariums, Silver Spring, Maryland. 238 p.
- Pough F.H. 2007. Amphibian Biology and Husbandry, *ILAR Journal*, 48(3):203-213.
- Relyea R.A. 2004a. Growth and Survival of Five Amphibian Species Exposed to Combinations of Pesticides, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(7):1737-1742.

- Relyea R.A. 2004b. Synergistic Impacts of Malathion and Predatory Stress on Six Species of North American Tadpoles, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(4):1080-1084.
- Relyea R.A. 2005a. The Lethal Impacts of Roundup and Predatory Stress on Six Species of North American Tadpoles, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(3):351-357.
- Relyea R.A. 2005b. The Lethal Impact of Roundup on Aquatic and Terrestrial Amphibians, *Ecological Applications*, 15(4):1118-1124.
- Robinson S.A., Chlebak R.J., Young S.D., Dalton R.L., Gavel M.J., Prosser R.S., Bartlett A.J., et de Solla S.R. 2021. Clothianidin Alters Leukocyte Profiles and Elevates Measures of Oxidative Stress in Tadpoles of the Amphibian, *Rana pipiens*, *Environmental Pollution*, 284:117149.
- Robinson S.A., Gavel M.J., Richardson S.D., Chlebak R.J., Milotic D., Koprivnikar J., et Forbes M.R. 2019a. Sub-Chronic Exposure to a Neonicotinoid Does Not Affect Susceptibility of Larval Leopard Frogs to Infection by Trematode Parasites, via Either Depressed Cercarial Performance or Host Immunity, *Parasitology Research*, 118(9):2621-2633.
- Robinson S.A., Richardson S.D., Dalton R.L., Maisonneuve F., Bartlett A.J., de Solla S.R., Trudeau V.L., et Waltho N. 2019b. Assessment of Sublethal Effects of Neonicotinoid Insecticides on the Life-History Traits of 2 Frog Species, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(9):1967-1977.
- Robinson S.A., Richardson S.D., Dalton R.L., Maisonneuve F., Trudeau V.L., Pauli B.D., et Lee-Jenkins S.S.Y. 2017. Sublethal Effects on Wood Frogs Chronically Exposed to Environmentally Relevant Concentrations of Two Neonicotinoid Insecticides, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(4):1101-1109.
- Robinson S.A., Young S.D., Brinovcar C., McFee A., et De Silva A.O. 2020. Ecotoxicity Assessment and Bioconcentration of a Highly Brominated Organophosphate Ester Flame Retardant in Two Amphibian Species, *Chemosphere*, 260:127631.
- Rocchini R.J., Servizi J.A., Watts R.G., Horvath S., Clark M.J.R., Singleton H.J., Young R.H., Sholund A., Jordan A.J., et McLeay D.J. 1982. Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Victoria, Colombie-Britannique. 25 p.
- Rowe C.L., et Freda J. 2000. Effects of Acidification on Amphibians at Multiple Levels of Biological Organization, In: *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, Sparling D.W., Linder G., et Bishop C.A. (dir.), Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, Floride, p. 545-571.
- Russell W.M.S., et Burch R.L. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen & Co. Ltd., Londres, Angleterre.
- Sager J.C., et McFarlane C. 1997. Radiation, dans : *Plant Growth Chamber Handbook*, Langhans R.W., et Tibbits T.W. (dir.), North Central Regional Research Publication N° 340, Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station Special Report N°. 90, Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa, p. 1-30.
- Sanzo D., et Hecnar S.J. 2006. Effects of Road De-Icing Salt (NaCl) on Larval Wood Frogs (*Rana sylvatica*), *Environmental Pollution*, 140(2):247-256.
- Schlesinger M.D., Feinberg J.A., Nazdrowicz N.H., Kleopfer J.D., Beane J.C., Bunnell J.F., Burger J., Corey E., Gipe K., Jaycox J.W., Kiviat E., Kubel J., Quinn D.P., Raithel C., Scott P.A., Wenner S.M., White E.L., Zarate B., et Shaffer H.B. 2018. Follow-Up Ecological Studies for Cryptic Species Discoveries: Decrypting the Leopard Frogs of the Eastern U.S., *PLoS ONE*, 13(11):e0205805.
- Schlichter L.C. 1981. Low pH Affects the Fertilization and Development of *Rana pipiens* Eggs, *Canadian Journal of Zoology*, 59(9):1693-1699.
- Scholz S., Sela E., Blaha L., Braunbeck T., Galay-Burgos M., García-Franco M., Guinea J., Klüver N., Schirmer K., Tanneberger K., Tobor-

- Kaplon M., Witters H., Belanger S., Benfenati E., Creton S., Cronin M.T.D., Eggen R.I.L., Embry M., Ekman D., Gourmelon A., Halder M., Hardy B., Hartung T., Hubesch B., Jungmann D., Lampi M.A., Lee L., Léonard M., Küster E., Lillicrap A., Lukenbach T., Murk A.J., Navas J.M., Peijnenburg W., Repetto G., Salinas E., Schüürmann G., Spielmann H., Tollefsen K.E., Walter-Rhode S., Whale G., Wheeler J.R., et Winter M.J. 2013. A European Perspective on Alternatives to Animal Testing for Environmental Hazard Identification and Risk Assessment, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 67(3):506-530.
- Shenoy K., Cunningham B.T., Renfroe J.W., et Crowley P.H. 2009. Growth and Survival of Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*) Tadpoles Exposed to Two Common Pesticides, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(7):1469-1474.
- Shumway W. 1940. Stages in the Normal Development of *Rana pipiens*, I. External Form, *The Anatomical Record*, 78(2):139-147.
- Sievers M., Hale R., Parris K.M., Melvin S.D., Lanctôt C.M., et Swearer S.E. 2019. Contaminant-Induced Behavioural Changes in Amphibians: A Meta-Analysis, *Science of the Total Environment*, 693:133570.
- Skerratt L.F., Berger L., Speare R., Cashins S., McDonald K.R., Phillott A.D., Hines H.B., et Kenyon N. 2007. Spread of Chytridiomycosis Has Caused the Rapid Global Decline and Extinction of Frogs, *EcoHealth*, 4:125-134.
- Smith S.A. 2007. Compendium of Drugs and Compounds Used in Amphibians, *ILAR Journal*, 48:297-300.
- Smith S.A., et Stoskopf M.K. 2007. The Art of Amphibian Science, *ILAR Journal*, 48(3):179-182.
- Smits J.E.G., Hersikorn B.D., Young R.F., et Fedorak P.M. 2012. Physiological Effects and Tissue Residues from Exposure of Leopard Frogs to Commercial Naphthenic Acids, *Science of the Total Environment*, 437:36-41.
- Sobotka J.M., et Rahwan R.G. 1994. Lethal Effect of Latex Gloves on *Xenopus laevis* Tadpoles, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 32(1):59.
- Société d'herpétologie du Canada. 2020. Northern Leopard Frog (*Lithobates pipiens*). URL : http://canadianherpetology.ca/species/species_page.html?cname=Northern%20Leopard%20Frog. Consulté le 2 décembre 2020.
- Soufan O., Ewald J., Zhou G., Hacariz O., Boulanger E., Alcaraz A.J., Hickey G., Maguire S., Pain G., Hogan N., Hecker M., Crump D., Head J., Basu N., et Xia J. 2022. EcoToxXplorer: Leveraging Design Thinking to Develop a Standardized Web-Based Transcriptomics Analytics Platform for Diverse Users, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(1):21-29.
- Sowers A.D., Mills M.A., et Klaine S.J. 2009. The Developmental Effects of a Municipal Wastewater Effluent on the Northern Leopard Frog, *Rana pipiens*, *Aquatic Toxicology*, 94:145-152.
- Sparling D.W., et Harvey G. 2006. Comparative Toxicity of Ammonium and Perchlorate to Amphibians, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 76(2):210-217.
- Sparling D.W., Linder G., Bishop C.A., et Krest S.K. (dir.). 2010. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, 2^e éd., CRC Press, Pensacola, Floride. 944 p.
- Sparling D.W., Linder G., et Bishop C.A. (dir.). 2000. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, Floride. 904 p.
- Sprague J.B. 1973. The ABC's of Pollutant Bioassay Using Fish, dans : *Biological Methods for the Assessment of Water Quality*, Cairns Jr J., et Dickson K. (dir.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie, Special Technical Publication 528, p. 6-30.
- Stanley J.K., Lotufo G.R., Biedenbach J.M., Chappell P., et Gust K.A. 2015. Toxicity of Conventional Energetics TNT and RDX Relative to New Insensitive Munitions Constituents DNAN and NTO in *Rana pipiens* Tadpoles, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(4):873-879.

- Stebbins R.C. 2003. *A Field Guide to Western Reptiles and Amphibians*, 3^{éd.}, Houghton Mifflin Harcourt, New York, New York. 560 p.
- Stephenson G.L., Koper N., Atkinson G.F., Solomon K.R., et Scroggins R.P. 2000. Use of Nonlinear Regression Techniques for Describing Concentration-Response Relationships of Plant Species Exposed to Contaminated Site Soils, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(12):2968-2981.
- Storrs Méndez S.I., Tillitt D.E., Rittenhouse T.A.G., et Semlitsch R.D. 2009. Behavioral Response and Kinetics of Terrestrial Atrazine Exposure in American Toads (*Bufo americanus*), *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(3):590-597.
- Stuart S.N., Chanson J.S., Cox N.A., Young B.E., Rodrigues A.S.L., Fischman D.L., et Waller R.W. 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide, *Science*, 306(5702):1783-1786.
- Thursby G.B., Heltshe J., et Scott K.J. 1997. Revised Approach to Toxicity Test Acceptability Criteria Using a Statistical Performance Assessment, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16:1322-1329.
- Timmons M.B., Guerdat T., et Vinci B.J. 2018. *Recirculating Aquaculture, Quatrième Édition*, Ithaca Publishing Company LLC, New York.
- Tompsett A.R., Wiseman S., Higley E., Giesy J.P., et Hecker M. 2013. Effects of Exposure to 17 α -Ethinylestradiol During Larval Development on Growth, Sexual Differentiation, and Abundances of Transcripts in the Liver of the Wood Frog (*Lithobates sylvaticus*), *Aquatic Toxicology*, 126:42-51.
- Torreilles S.L., McClure D.E., et Green S.L. 2009. Evaluation and Refinement of Euthanasia Methods for *Xenopus laevis*, *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48(6):512-516.
- TOXSTAT. 1996. Version 3.5, Lincoln Research Associates Inc., PO 4276, Bisbee, Arizona 85603, États-Unis, tél. : 520-432-4092, courriel : danlra@msn.com. [Programmes sur disquette et guide imprimé de l'utilisateur.]
- Trudeau V.L., Schueler F.W., Navarro-Martin L., Hamilton C.K., Bulaeva E., Bennett A., Fletcher W., et Taylor L. 2013. Efficient Induction of Spawning of Northern Leopard Frogs (*Lithobates pipiens*) During and Outside the Natural Breeding System, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(14):1-9.
- Trudeau V.L., Somoza G.M., Natale G.S., Pauli B., Wignall J., Jackman P., Doe K., et Schueler F.W. 2010. Hormonal Induction of Spawning in 4 Species of Frogs by Coinjection with a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist and a Dopamine Antagonist, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(36):1-9.
- Trudeau V.L., Thomson P., Zhang W.S., Reynaud S., Navarro-Martin L., et Laglois V.S. 2020. Agrochemicals Disrupt Multiple Endocrine Axes in Amphibians, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 513:110861.
- UE (Union européenne). 2010. Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, *Journal officiel de l'Union européenne*, L 276 :33-79.
- Ultsch G.R., Bradford D.F., et Freda J. 1999. Physiology: Coping with the Environment, dans : *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*, McDiarmid R.W., et Altig R. (dir.), University of Chicago Press, Chicago, Illinois, p. 189-214.
- US Fish and Wildlife Service. 2011. Endangered and Threatened Wildlife and Plants; 12-Month Finding on a Petition to List the Northern Leopard Frog in the Western United States as Threatened; Proposed Rule, 50 CFR Part 17 [Docket N°. FWS-R2-ES-2009-0030; 92210-1111-FY08-B2], *Federal Register*, 76(193):61896-61931.
- USEPA (Environmental Protection Agency des États-Unis). 1975 Methods for Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates, and Amphibians, Environmental Protection Agency des États-Unis, National Environmental Research Centre, Office of Research and Development, Corvallis, Oregon, EPA-660/3-75-009. 69 p.

- USEPA. 1996. Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1800 Tadpole/Sediment Subchronic Toxicity Test, Environmental Protection Agency des États-Unis, Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C., EPA 712-C-96-132. 15 p.
- USEPA. 2002. Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms, Environmental Protection Agency des États-Unis, Office of Water, Washington, D.C., EPA-821-R-02-013 4^e éd. 350 p.
- USEPA. 2009. Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1100: Amphibian Metamorphosis (Frog), Environmental Protection Agency des États-Unis, Prevention Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C., EPA 740-C-09-002. 50 p.
- USEPA. 2015. Endocrine Disruptor Screening Program Test Guideline OCSP 890.2300: Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), Environmental Protection Agency des États-Unis, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Washington, D.C., EPA Pub. N° 740-C-15-001. 89 p.
- Van der Vliet L., Taylor L.N., et Scroggins R. 2012. NOEC: Notable Oversight of Enlightened Canadians: A Response to van Dam *et al.* (2012), *Integrated Environmental Assessment and Management*, 8(3):397-398.
- Van Schmidt N.D., Cary T.L., Ortiz-Santaliestra M.E., et Karasov W.H. 2012. Effects of Chronic Polybrominated Diphenyl Ether Exposure on Gonadal Development in the Northern Leopard Frog, *Rana pipiens*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(2):347-354.
- Van Dam R.A., Harford A.J., et Warne M.S.J. 2012. Time to Get Off the Fence: The Need for Definitive International Guidance on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data, *Integrated Environmental Assessment and Management*, 8(2):242-245.
- Van der Hoeven N. 1998. Power Analysis for the NOEC: What is the Probability of Detecting Small Toxic Effects on Three Different Species using the Appropriate Standardized Test Protocols?, *Ecotoxicology*, 7:355-361.
- Veldhoen N., Skirrow R.C., Brown L.L.Y., van Aggelen G., et Helbing C.C. 2014. Effects of Acute Exposure to the Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Ibuprofen on the Developing North American Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Tadpoles, *Environmental Science and Technology*, 48(17):10439-10447.
- Veldhoen N., Skirrow R.C., Osachoff H., Wigmore H., Clapson D.J., Gunderson M.P., van Aggelen G., et Helbing C.C. 2006. The Bactericidal Agent Triclosan Modulates Thyroid Hormone-Associated Gene Expression and Disrupts Postembryonic Anuran Development, *Aquatic Toxicology*, 80(3):217-227.
- Voordouw M.J., Adama D., Houston B., Govindarajulu P., et Robinson J. 2010. Prevalence of the Pathogenic Chytrid Fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*, in an Endangered Population of Northern Leopard Frogs, *Rana pipiens*, *BMC Ecology*, 10(6):1-10.
- Vu M., Weiler B., et Trudeau V.L. 2017. Time- and Dose-Related Effects of a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist and Dopamine Antagonist on Reproduction in the Northern Leopard Frog (*Lithobates pipiens*), *General and Comparative Endocrinology*, 254:86-96.
- Wagner N., Reichenbecher W., Teichmann H., Tappeser B., et Lötters S. 2013. Questions Concerning the Potential Impact of Glyphosate-Based Herbicides on Amphibians, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(8):1688-1700.
- Wake D.B., et Vredenburg V.T. 2008. Are We in the Midst of the Sixth Mass Extinction? A View from the World of Amphibians, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105:11466-11473.
- Weir S.M., Yu S., et Salice C.J. 2012. Acute Toxicity of Herbicide Formulations and Chronic Toxicity of Technical-Grade Trifluralin to Larval Green Frogs (*Lithobates clamitans*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(9):2029-2034.

- Weltje L., Simpson P., Gross M., Crane M., et Wheeler J.R. 2013. Comparative Acute and Chronic Sensitivity of Fish and Amphibians: A Critical Review of Data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(5):984-994.
- Whitaker B.R. 2001. Water Quality. Dans: *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*, Wright K.M., et Whitaker B.R. (dir.), Kreiger Publishing Company, Malabar, Floride, p. 147-157.
- Williams B.K., et Semlitsch R.D. 2010. Larval Responses of Three Midwestern Anurans to Chronic, Low-Dose Exposures of Four Herbicides, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3):819-827.
- Wilson G.A., Fulton T.L., Kendell K., Scrimgeour G., Paszkowski C.A., et Coltman D.W. 2008. Genetic Diversity and Structure in Canadian Northern Leopard Frog (*Rana pipiens*) Populations: Implications for Reintroduction Programs, *Revue canadienne de zoologie*, 86(8):863-874.
- Wojnarowicz P., Ogunlaja O.O., Xia C., Parker W.J., et Helbing C.C. 2013. Impact of Wastewater Treatment Configuration and Seasonal Conditions on Thyroid Hormone Disruption and Stress Effects in *Rana catesbeiana* Tailfin, *Environmental Science and Technology*, 47(23):13840-13847.
- Wright K.M., et Whitaker B.R. (dir.). 2001. *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*, Krieger Publishing Company, Malabar, Floride. 499 p.
- Yahnke A.E., Grue C.E., Hayes M.P., et Troiano A.T. 2013. Effects of the Herbicide Imazapyr on Juvenile Oregon Spotted Frogs, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(1):228-235.
- Yee S.G., McLeay D.J., et Fennel M. 1996. Recent Laboratory Studies Related to Improving Environment Canada's Biological Test Method EPS 1/RM/28 Using Rainbow Trout Embryos ("E" Toxicity-test Option)", rapport préparé par McLeay Environmental Ltd. Pour Environnement Canada, Ottawa, Ontario.
- Young S.D., Gavel M.J., Gutierrez-Villagomez J.M., Forbes M.R., et Robinson S.A. 2019. Assessment of Sublethal Ecotoxicity of Solvents on Larvae of a Model Native Amphibian (*Lithobates pipiens*), *Journal of Applied Toxicology*, 40(4):483-492.
- Yu S., Wages M.R., Cai Q., Maul J.D., et Cobb G.P. 2013. Lethal and Sublethal Effects of Three Insecticides on Two Developmental Stages of *Xenopus laevis* and Comparison with Other Amphibians, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(9):2056-2064.

Annexe A

Méthodes d'essai biologique et guides à l'appui publiés par l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement et Changement climatique Canada^a

Titre de la méthode ou du guide	N° de publication	Date de publication	Date des modifications applicables
A. — Méthodes génériques (universelles)			
Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/9	Juillet 1990	Mai 1996, mai 2007
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 ^{me} édition	Février 2007	—
Essai de croissance et de survie sur les larves têtes-de-boule	SPE 1/RM/22 2 ^{me} édition	Février 2011	—
Essai de toxicité sur la bactérie luminescente	SPE 1/RM/24	Novembre 1992	—
Essai d'inhibition de la croissance d'une algue d'eau douce	EPS 1/RM/25 2 ^{me} 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 verts et oursins plats)	SPE 1/RM/27 2 ^{me} édition	Février 2011	—
Essais toxicologiques sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique	SPE 1/RM/28 2 ^{me} 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	—
Essai de survie, de croissance et de reproduction de l'amphipode dulcicole <i>Hyaella azteca</i> dans les sédiments et l'eau	SPE 1/RM/33 3 ^{me} édition	Septembre 2017	—
Essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole <i>Lemna minor</i>	SPE 1/RM/37 2 ^{me} édition	Janvier 2007	—

^a On peut acheter ces documents du Catalogue des publications d'Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3, Canada. Il est également possible de demander des copies imprimées par courriel à l'adresse : methods@ec.gc.ca. Il est également possible de les télécharger gratuitement en format PDF à partir de l'adresse suivante : <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/recherche-faune-science-paysage/publications-methodes-essai-biologique.html>. Pour obtenir de plus amples renseignements ou formuler des observations, prière de s'adresser au gestionnaire, Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, ECCC, Ottawa, K1A 0H3.

Titre de la méthode ou du guide	N° de publication	Date de publication	Date des modifications applicables
A. — Méthodes génériques(universelles) [suite]			
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 réaction d'évitement ou la reproduction des vers de terre (<i>Eisenia andrei</i> ou <i>Dendrodrilus rubidus</i>) exposés à des contaminants dans le sol	DGST 1/RM/43 2 ^{me} édition	Août 2022	—
Essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à de 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 2 ^{me} édition	Février 2014	—
Essai de croissance de plantes terrestres indigènes de la région boréale exposées à un sol contaminé	SPE 1/RM/56	Août 2013	—
Essai de mesure de la reproduction des acariens oribates exposés à des contaminants dans le sol	DGST 1/RM/61	Septembre 2020	—
Essais de toxicité sur des grenouilles (<i>Lithobates pipiens</i>) selon leurs stades de développement aquatiques	DGST RM/62	Avril 2024	—
B. — Méthodes de référence^b			
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë à l'aide de l'épinoche à trois épines	SPE 1/RM/10 2 ^{me} édition	Décembre 2017	—
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 2 ^{me} édition	Décembre 2000	Mai 2007, février 2016, décembre 2023
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez <i>Daphnia magna</i>	SPE 1/RM/14 2 ^{me} édition	Décembre 2000	Février 2016
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	—
Méthode de référence pour mesurer la toxicité des sédiments contaminés chez les embryons et les larves des échinides (oursins globuleux ou oursins plats)	SPE 1/RM/58	Juillet 2014	—

^b Dans cette collection, on entend par méthode de référence une méthode biologique particulière d'essai de la toxicité, c'est-à-dire une méthode écrite, assortie d'un ensemble explicite de consignes et de conditions décrites avec précision. Contrairement aux méthodes universelles (polyvalentes ou génériques) publiées par Environnement et Changement climatique Canada, les méthodes de référence sont souvent limitées, dans leur emploi, aux essais exigés par un règlement particulier.

Titre de la méthode ou du guide	N° de publication	Date de publication	Date des modifications applicables
B. — Méthodes de référence [suite]			
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë chez le copépode <i>Acartia tonsa</i>	DGST 1/RM/60	Juin 2019	–
C. — Documents d’orientation et guides			
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	–
Procédure recommandée pour l’importation d’organismes destinés à des essais de toxicité sublétales	–	Septembre 1999	–
Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l’interprétation de leurs résultats	SPE 1/RM/34	Décembre 1999	–
Procédure révisée pour l’ajustement de la salinité d’échantillons d’effluents soumis à un essai de toxicité sublétales en milieu marin conduit dans le cadre des programmes d’étude de suivi des effets sur l’environnement (ESEE)	–	Décembre 2001	–
Guide des essais de pathogénicité et de toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les organismes aquatiques et terrestres	SPE 1/RM/44 2 ^{me} édition	Décembre 2016	–
Document d’orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d’écotoxicité	SPE 1/RM/46	Mars 2005	June 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	–
Guide d’échantillonnage et de préparation de sol contaminé aux fins d’essais biologiques	SPE 1/RM/53	Février 2012	–
Procédure de stabilisation du pH pendant un essai de létalité aiguë des effluents des fabriques de pâtes et papiers chez la truite arc-en-ciel	DGST 1/RM/59	Mars 2018	–
Conseils supplémentaires pour l’étude de la létalité aiguë des effluents des fabriques de pâtes et papiers due à l’ammoniac	–	Mars 2018	–

Annexe B

Environnement et Changement climatique Canada, laboratoires d'essai environnemental régionaux

Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique

Immeuble des sciences de l'environnement
443, avenue Université, Université de Moncton
Moncton (Nouveau-Brunswick)
E1A 3E9

Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon

Centre des sciences environnementales du Pacifique
2645, route Dollarton
North Vancouver (Colombie-Britannique)
V7H 1B1

Laboratoire des essais environnementaux du Québec

105, rue McGill
Montréal (Québec)
H2Y 2E7

Laboratoire des essais environnementaux des Prairies et du Nord

Northern Forestry Building
5320, 122 St NW
Edmonton (Alberta)
T6H 3S5

Laboratoire de toxicologie des sols

River Road S et T Branch Laboratories
335, chemin River
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

Pour obtenir les coordonnées actuelles des personnes-ressources du laboratoire régional, veuillez communiquer avec :

Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et Changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3
Email: methods@ec.gc.ca

Annexe C

Composition du Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité (en juin 2023)

Administration fédérale, Environnement et Changement climatique Canada

Suzanne Agius
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Québec)

Adrienne Bartlett
Division de la recherche sur les contaminants
aquatiques
Burlington (Ontario)

Megan Bauer
Laboratoire des essais environnementaux de
l'Atlantique
Moncton (Nouveau-Brunswick)

Lee Beaudette
Section de recherche en toxicologie de la faune
Ottawa (Ontario)

Rene Beaulieu
Laboratoire des essais environnementaux des
Prairies et du Nord
Edmonton (Alberta)

Patrick Boyd
Section de l'évaluation biologique et
normalisation
Ottawa (Ontario)

Julia Brydon
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Québec)

Craig Buday
Laboratoire des essais environnementaux du
Pacifique et du Yukon
North Vancouver (Colombie-Britannique)

Sheena Campbell
Division de la recherche sur les contaminants
aquatiques
Burlington (Ontario)

Marshneil Chandra
Laboratoire des essais environnementaux des
Prairies et du Nord
Edmonton (Alberta)

Ajith Dias Samarajeewa
Section de l'évaluation biologique et
normalisation
Ottawa (Ontario)

Heather Dillon
Laboratoire des essais environnementaux des
Prairies et du Nord
Edmonton (Alberta)

Ken Doe (émérite)
Laboratoire des essais environnementaux de
l'Atlantique
Moncton (Nouveau-Brunswick)

Richard Frank
Division de la recherche sur les contaminants
aquatiques
Burlington (Ontario)

Christopher Fraser
Section des évaluations prioritaires
Ottawa (Ontario)

François Gagné
Division de la recherche sur les contaminants
aquatiques
Montréal (Québec)

Patty Gillis
Division de la recherche sur les contaminants
aquatiques
Burlington (Ontario)

Ève Gilroy
Division de la recherche sur les contaminants
aquatiques
Burlington (Ontario)

Christina Heise
Laboratoire des essais environnementaux des
Prairies et du Nord
Edmonton (Alberta)

Charles Hopper
Laboratoire des essais environnementaux de
l'Atlantique
Moncton (Nouveau-Brunswick)

Natasha Hostal
Laboratoire des essais environnementaux des
Prairies et du Nord
Edmonton (Alberta)

Paula Jackman (émérite)
Laboratoire des essais environnementaux de
l'Atlantique
Moncton (Nouveau-Brunswick)

Heather Jovanovic
Division de la recherche sur les contaminants
aquatiques
Burlington (Ontario)

Hufsa Khan
Division de la recherche sur les contaminants
aquatiques
Burlington (Ontario)

Stephanie Kvas
Section de l'évaluation biologique et
normalisation
Ottawa (Ontario)

Chris Le
Laboratoire des essais environnementaux du
Pacifique et du Yukon
North Vancouver (Colombie-Britannique)

Heather Lemieux
Section de l'évaluation biologique et
normalisation
Ottawa (Ontario)

Michelle Linssen-Sauvé
Laboratoire des essais environnementaux du
Pacifique et du Yukon
North Vancouver (Colombie-Britannique)

Sue Ellen Maher
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Québec)

Bill Martin
Bureau national des recommandations et des
normes
Ottawa (Ontario)

Carolyn Martinko (coprésidente)
Section de l'évaluation biologique et
normalisation
Ottawa (Ontario)

Danielle Milani
Division de la recherche sur les contaminants
aquatiques
Burlington (Ontario)

Alicia O'Neill
Division de la recherche sur les contaminants
aquatiques
Burlington (Ontario)

Joanne Parrott
Division de la recherche sur les contaminants
aquatiques
Burlington (Ontario)

Linda Porebski
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Québec)

Juliska Princz
Section de l'évaluation biologique et
normalisation
Ottawa (Ontario)

Rick Scroggins
Section de l'évaluation biologique et
normalisation
Ottawa (Ontario)

David Taillefer
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Québec)

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

Leana Van der Vliet
Section de l'évaluation biologique et
normalisation
Ottawa (Ontario)

Jessica Velicogna
Section de l'évaluation biologique et
normalisation
Ottawa (Ontario)

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

Peter Wells (émérite)
Service de la conservation de l'environnement
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)

Administration fédérale, Santé Canada

Ellyn Ritchie
Agence de réglementation de la lutte
antiparasitaire
Direction de l'évaluation environnementale
Gatineau, Québec

Administration fédérale, Ressources naturelles Canada

Morgan King
Programme gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales
CANMET
Ottawa (Ontario)

Carrie Rickwood
Programme gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales
CANMET
Ottawa (Ontario)

Administration provinciale

Melanie Appleton
Ministère de l'Environnement, de la Protection de
la nature et des Parcs de l'Ontario
Etobicoke (Ontario)

Lisa Kennedy (coprésidente)
Ministère de l'Environnement, de la Protection de
la nature et des Parcs de l'Ontario
Etobicoke (Ontario)

Heather Osachoff
Stratégie du ministère de l'environnement et du
changement climatique de la Colombie-
Britannique
Victoria (Colombie-Britannique)

David Poirier (émérite)
Ministère de l'Environnement, de la Protection de
la nature et des Parcs de l'Ontario
Etobicoke (Ontario)

Kathleen Stevack
Ministère de l'Environnement, de la Protection de
la nature et des Parcs de l'Ontario
Etobicoke (Ontario)

Éloïse Veilleux
Centre d'expertise en analyse environnementale du
Québec
Ste. Foy (Québec)

Kirstin Webster
Stratégie du ministère de l'environnement et du
changement climatique de la Colombie-
Britannique
Victoria (Colombie-Britannique)

Annexe D

Rédacteurs de la méthode et membres du comité d'experts pour l'examen par les pairs

Coordinateur de la méthode et collaborateurs d'UEAM

Leana Van der Vliet
Coordinateur de la méthode
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario) K1V 1C7

Rick Scroggins
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario) K1V 1C7

Lisa Taylor (retraîtée)
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario) K1V 1C7

Carolyn Martinko
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario) K1V 1C7

Rédacteur de la méthode externe

Jennifer Miller
Miller Environmental Sciences Inc.
18600, chemin Marsh Hill
Uxbridge (Ontario) L9P 1R3

Réviseur technique d'ECCE

Paula Jackman (retraîtée)
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et changement climatique Canada
Campus de l'Université de Moncton
443, avenue University
Moncton (Nouveau-Brunswick) E1A 3E9

Les pairs examinateurs experts

Doug Fort
Fort Environmental Laboratories Inc.
515 South Duncan
Stillwater (Oklahoma) 74074

Melanie Gallant
Nautilus Environmental Company Inc.
10823 27 Street SE
Calgary (Alberta) T2Z 3V9

Elissa Liu
Division de la gestion des substances chimiques
Direction générale de la protection de
l'environnement
Environnement et changement climatique Canada
101-401 Burrard Street
Vancouver (Colombie-Britannique) V6C 3R2

Bonnie Lo
Simon Fraser University
8888 University Dr W,
Burnaby (Colombie-Britannique) V5A 1S6

Stacey Robinson
Division de l'écotoxicologie et de la santé de la
faune
Section de la recherche en toxicologie de la faune
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et changement climatique Canada
1125, promenade Colonel By
Ottawa (Ontario) K1S 5B6

Annexe E

Modes opératoires supplémentaires pour l'élevage de *Lithobates pipiens* en laboratoire et modes opératoires généraux pour l'élevage des grenouilles

Les § 2.1, 2.2 et 2.4 fournissent de nombreux détails sur l'origine des grenouilles adultes pour le frai ou l'hibernation, le moment de la collecte et du transport vers le laboratoire, ainsi que des conseils sur le maintien, l'hibernation, l'élevage et la mise en quarantaine. Cette annexe contient des renseignements supplémentaires sur l'élevage des adultes de *Lithobates pipiens* en laboratoire et des conseils généraux sur leur élevage.

E.1 Élevage de grenouilles adultes : orientations et ressources supplémentaires

E.1.1 Remerciements et ressources supplémentaires

Les orientations décrites au § 2.4 et dans cette annexe ont été élaborées au Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique (LEEA) d'Environnement et Changement climatique Canada, avec la participation d'Andrea Edgington (Université de Guelph), du Dr Vance Trudeau (Université d'Ottawa) et de l'Aquarium de Vancouver. Des grenouilles léopards (*Lithobates pipiens*) ont été élevées et maintenues avec succès au LEEA à tous les stades de leur développement (c.-à-d. des masses d'œufs aux têtards, spécimens métamorphes et adultes; LEEA, 2004, 2006, 2009, 2013, 2018). Ces méthodes ont également été utilisées avec succès pour maintenir des adultes de *Lithobates pipiens* dans un laboratoire privé (Nautilus Environmental, 2016). Le lecteur est invité à consulter les références suivantes pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'élevage et la reproduction des amphibiens : « Amphibian Medicine and Captive Husbandry » [Médecine des amphibiens et élevage en captivité] (Wright et Whitaker, 2001) et « Amphibian Husbandry Resource Guide, Edition 2.0 » [Guide de ressources sur l'élevage des amphibiens, édition 2.0] (Poole et Grow, 2012), qui fournissent des renseignements utiles sur les maladies, les produits pharmaceutiques et les manipulations hormonales; « CCAC Guidelines : Amphibians » [Lignes directrices du CCPA : Amphibiens] (CCPA, 2021); l'édition spéciale de l'Institute for Laboratory Animal Research Journal intitulée « Use of Amphibians in the Research, Laboratory, or Classroom Setting » [Utilisation d'amphibiens dans le cadre de la recherche, du laboratoire ou de la salle de classe] (Alworth et Harvey, 2007; Browne et Zippel, 2007; Browne *et al.*, 2007; Burggren et Warburton, 2007; Densmore et Green, 2007; Gentz, 2007; Hopkins, 2007; Nolan et Smith, 2007; O'Rourke, 2007; Pough, 2007; Smith, 2007; Smith et Stoskopf, 2007). Les figures E.1 et E.2 présentent des exemples de contenants convenant aux grenouilles adultes.

E.1.2 Nourriture pour grenouilles adultes

Les grillons achetés en animalerie peuvent être conservés jusqu'à deux semaines. Pour obtenir de petits grillons, placer un substrat (c.-à-d. un récipient contenant un mélange de sable et de terre) dans l'aquarium contenant les grillons pour permettre aux adultes de pondre des œufs; garder le récipient couvert pendant environ six semaines jusqu'à l'éclosion des grillons ayant la grosseur d'une tête d'épingle. Ces jeunes grillons peuvent également être achetés auprès de fournisseurs locaux. Les grillons reçoivent de la nourriture pour grillons disponible dans le commerce et des flocons d'avoine. Pour apporter de l'humidité, on peut également utiliser des éponges humides, des serviettes en papier humides, de la bouillie pour grillon du commerce ou des légumes (p. ex. des pommes de terre ou des carottes). Des boîtes à œufs et/ou des tubes en carton d'essuie-tout sont placés dans les réservoirs pour servir de cachettes. On peut compléter l'alimentation des grenouilles par des larves de ténébrion nouvellement écloses lorsqu'elles sont disponibles. On place les larves de ténébrion élevées en laboratoire dans de petits récipients contenant un mélange de son et de farine d'épeautre biologique. Les récipients sont recouverts de papier absorbant brun. Des morceaux de pommes de terre sont ajoutés aux récipients de maintien en fonction des besoins. Il faudrait affiner les élevages et remplacer les substrats environ toutes les six semaines, lorsque le son a disparu et que le milieu apparaît très sableux. Les vieilles larves de ténébrion ne sont pas utilisées pour l'alimentation, car leur exosquelette est trop difficile à digérer. On a régulièrement et convenablement utilisé des larves de ténébrion pour nourrir les grenouilles de différents âges au LEEA (en particulier les petites grenouilles).

On peut également utiliser des vers de terre (*Eisenia andrei*) provenant des élevages destinés aux essais en laboratoire (v. ECCC, 2022a) pour nourrir les grenouilles. Toutefois, la documentation mentionne des insectes utilisés comme source de nourriture, notamment les larves de ténébrion, les vers de terre et les mouches des fruits, qui présentent de faibles niveaux de calcium ou de mauvais rapports calcium:phosphore; il est donc recommandé de saupoudrer les insectes d'une poudre riche en calcium avant la distribution de nourriture (Densmore et Green, 2007) (on recommande un mélange 1:4 de vitamines et de carbonate de calcium au moins deux fois par semaine; v. § 2.4.2).

E.1.3 Identification des grenouilles adultes

Pour identifier chaque grenouille léopard adulte, on peut mettre une mention sur le réservoir et utiliser une identification photographique de chaque grenouille (v. les exemples à la fig. E.3). Le « registre des grenouilles » peut comprendre : une photographie des taches, le poids, l'origine, la date de réception, les parentés (le cas échéant), les dosages et les dates des médicaments (le cas échéant), ainsi que les tentatives de reproduction (y compris les détails sur l'hibernation et l'injection d'hormones; v. annexe F). On a réussi à identifier toutes les grenouilles du LEEA de cette manière; des grenouilles de 2 grammes ont été photographiées et identifiées ultérieurement grâce à leurs taches. Il est également possible de marquer les grenouilles aux fins d'identification (v. annexe 2, CCPA, 2021).

E.2 Quarantaine et maladies : orientations complémentaires

On peut envisager un traitement prophylactique lorsque l'on reçoit de nouveaux lots de grenouilles adultes et il faudrait en discuter avec un vétérinaire. Au LEEA, les grenouilles ont déjà été placées dans un bain de tétracycline (préparé dans du chlorure de sodium à 0,6 % avec une dose de tétracycline de 10 µg/mL) pendant 20 minutes avant la mise en quarantaine; cependant, plus récemment, des échantillons fécaux ont été recueillis et analysés à la réception d'un nouveau lot de grenouilles avant d'effectuer tout traitement (P. Jackman, Environnement et Changement climatique Canada, Moncton [Nouveau-Brunswick], communication personnelle, 2022). Le § 2.4.4 donne des indications sur la durée de la quarantaine. Les réservoirs pour la mise en quarantaine doivent être séparés de tous les réservoirs de grenouilles de laboratoire actuels (§ 2.4.4). Il faudrait examiner toute mortalité dans le nouveau réservoir en soumettant des échantillons à des essais pathologiques afin de déterminer si une maladie est présente et si un traitement est nécessaire. On peut prélever des échantillons fécaux sur de nouveaux lots de grenouilles et les envoyer aux fins d'analyse parasitaire; si un lot de grenouilles est conservé au laboratoire pendant une période prolongée, il est recommandé de prélever et d'analyser des échantillons fécaux régulièrement (p. ex. tous les trois mois). On peut aussi prélever des échantillons d'écouvillons pour vérifier la présence de *Ranavirus*. Consulter l'annexe E.2.2 afin d'obtenir plus de détails sur l'échantillonnage de manière à déceler les maladies. En cas de suspicion de maladie, la grenouille devrait être isolée. Il faudrait changer les gants (v. annexe E.2.1) après tout contact avec une grenouille potentiellement infectée, et tout le matériel devrait être désinfecté avec une solution appropriée (p. ex. Wescodyne^{MC}). Si les résultats sont positifs, on administre des traitements et les échantillons fécaux sont réitérés quatre semaines après le traitement. Il faudrait consulter un vétérinaire lors du diagnostic de la maladie et tout au long du traitement.

Si le taux de mortalité est faible et que les résultats fécaux sont négatifs, les grenouilles peuvent être retirées de la quarantaine et transférées dans l'installation d'élevage principale. Tout résultat fécal ou pathologique positif devrait être abordé avec un vétérinaire ou un spécialiste des maladies animales en vue d'un éventuel traitement ou d'essais supplémentaires avant la levée de la quarantaine.

Dans certains cas, il peut être nécessaire d'euthanasier une grenouille (v. § 4.5 et CCPA, 2010, 2021). Cette décision peut être exigée en cas de maladie grave, de mauvais état de santé (émaciation), de développement anormal influant sur la santé de l'animal, de détresse ou de douleur évidente, ou sur ordre d'un vétérinaire.

E.2.1 Gants

Le port de gants est obligatoire pour manipuler les grenouilles (v. § 2.3.9 et 2.4.4), et aucun transfert de

grenouilles, d'eau ou de matériaux entre les réservoirs n'est autorisé pendant la quarantaine. On recommande d'utiliser des gants rincés et non poudrés; des gants en nitrile ont été utilisés avec succès au LEEA (P. Jackman, Environnement et Changement climatique Canada, Moncton [Nouveau-Brunswick], communication personnelle, 2022). On ne doit pas utiliser de gants en latex, sauf s'il a été prouvé qu'ils n'étaient pas toxiques dans le cadre d'une étude de laboratoire. Cependant, toutes les marques et tous les types de gants sont potentiellement toxiques et ne devraient pas être utilisés tant qu'ils n'ont pas été testés avec les espèces devant être utilisées. En outre, la production d'une marque de gants donnée peut varier; des essais intermittents devraient être effectués sur les nouveaux lots de gants pour s'assurer de leur sécurité d'utilisation (Cashins *et al.*, 2008; Greer *et al.*, 2009). Le port de gants est obligatoire pour manipuler les *L. pipiens* à tous les stades de développement afin d'éviter la transmission accidentelle d'organismes pathogènes potentiels ou d'autres matières pouvant être nocives pour les organismes. Les gants en latex et en nitrile se sont révélés extrêmement toxiques pour diverses espèces de larves d'amphibiens, même lorsqu'ils sont utilisés pour le nettoyage et l'entretien généraux des réservoirs contenant des organismes (Sobotka et Rahwan, 1994; Gutleb *et al.*, 2001). Les conclusions de Cashins *et al.* (2008) concernant les gants en latex et en nitrile étaient semblables, mais elles indiquaient également que les gants en vinyle, s'ils n'étaient pas rincés avant utilisation, pouvaient entraîner la mortalité des têtards, même après des expositions de courte durée lors de manipulations de routine. D'après ces résultats, il est recommandé d'utiliser des gants en nitrile ou en vinyle bien rincés et non poudrés lors du nettoyage des aquariums ou de la manipulation des grenouilles, à condition qu'ils s'avèrent non toxiques dans le cadre d'une étude en laboratoire.

E.2.2 Prélèvement d'échantillons pour déterminer la présence de maladies

Il faudrait examiner toute mortalité dans un nouveau réservoir en soumettant des échantillons à des essais pathologiques afin de déterminer si une maladie est présente et si un traitement est nécessaire (v. § 2.4.4).

Des échantillons fécaux peuvent être prélevés sur de nouveaux lots de grenouilles et soumis à des analyses parasitaires. On peut les prélever dans l'eau du réservoir d'élevage à l'aide d'une baguette de verre à large diamètre munie d'une poire ou d'une pipette en plastique jetable dont l'extrémité a été coupée. Les matières fécales et un peu d'eau d'élevage sont aspirées dans la pipette, puis expulsées dans un récipient d'échantillonnage en plastique. Il faudrait prélever autant de matières fécales que possible, en veillant à placer tous les prélèvements d'un même réservoir dans le même récipient d'échantillonnage. Chaque réservoir d'élevage devrait avoir son propre récipient d'échantillonnage contenant plusieurs prélèvements de matières fécales. Chaque récipient d'échantillonnage devrait être étiqueté avec le numéro du réservoir, la date du prélèvement et le nom de la personne qui l'a prélevé. Une fois l'échantillonnage terminé, on devrait placer les récipients dans une glacière sur de la glace et les expédier aux fins d'analyse parasitaire. Les instructions relatives à l'échantillonnage et à l'expédition fournies par le laboratoire d'analyse devraient être suivies si elles diffèrent des recommandations énumérées ici.

On peut également prélever des échantillons d'écouvillons et les analyser par PCR pour détecter le champignon responsable de la chytridiomycose (v. annexe E.2.2). Il faudrait utiliser des écouvillons en polyester munis de bâtonnets en plastique pour prélever des échantillons qui seront analysés par PCR en vue de détecter le champignon responsable des chytrides. Les écouvillons devraient être placés dans un récipient en plastique sec. Un écouvillon peut être utilisé par grenouille, mais les échantillons provenant d'un même réservoir d'élevage peuvent être combinés dans un seul récipient d'échantillonnage pour déterminer si le champignon responsable des chytrides est présent dans un réservoir d'élevage. On devrait placer les récipients dans une glacière sur de la glace et les expédier aux fins d'analyse. Les instructions relatives à l'échantillonnage et à l'expédition fournies par le laboratoire d'analyse devraient être suivies si elles diffèrent des recommandations énumérées ici.

E.2.3 Maladies courantes touchant les grenouilles adultes et les têtards

Un certain nombre d'organismes pathogènes provoquant des maladies infectieuses chez *L. pipiens* menacent la santé et la survie de ces animaux, tant dans la nature qu'en captivité. Il s'agit notamment de virus, de champignons, de bactéries, de moisissures et de parasites. Un examen approfondi des maladies courantes des amphibiens est proposé par Densmore et Green (2007).

L'infection Ranavirus chez les amphibiens est causée par de multiples « espèces » de virus étroitement apparentés placés dans le genre *Ranavirus*. Les ranavirus sont très infectieux, car les doses d'inoculation peuvent être très faibles. Les signes cliniques de la maladie ranavirale aiguë observés chez les têtards, les spécimens métamorphes, les jeunes et les adultes comprennent une diminution de l'activité, une posture corporelle ou un comportement natatoire anormaux, des ascites, des ulcérations cutanées, des hémorragies focales et la mort. Aucun vaccin contre le ranavirus n'est actuellement disponible pour les amphibiens et il n'existe aucun traitement ou remède connu.

La chytridiomycose, ou chytride, est une maladie en augmentation causée par le champignon pathogène hautement transmissible *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*); cette maladie a provoqué un déclin rapide de la population ou l'extinction de 200 espèces de grenouilles dans le monde (Skerratt *et al.*, 2007). Le champignon est transmis par des zoospores qui ont besoin d'un milieu aquatique. Le champignon cible les tissus kératinisés, y compris l'appareil buccal des têtards et la peau des grenouilles métamorphosées (Berger *et al.*, 1998; Voordouw *et al.*, 2010). Les têtards peuvent être facilement infectés, mais ne présentent pas toujours d'effets cliniques évidents. Les signes cliniques de la chytridiomycose chez les amphibiens postmétamorphiques peuvent inclure une hyperkératose (épaississement de la couche externe de la peau), une desquamation excessive de la peau, et une mort soudaine (Berger *et al.*, 1998; Voordouw *et al.*, 2010). D'autres signes cliniques chez les jeunes et les adultes peuvent inclure des changements posturaux anormaux (p. ex. les pattes arrière sont écartées des flancs), la perte du réflexe de redressement, des changements de comportement (p. ex. léthargie, grenouille nocturne assise à la lumière du jour, insensible aux stimuli, absence de réaction de fuite ou absence de peur lorsqu'elle est manipulée), des rougeurs et une vascularisation des extrémités. La prévalence de l'infection par *Bd* chez les populations de *L. pipiens* a été observée jusqu'à 18,6 % en Colombie-Britannique (Voordouw *et al.*, 2010), 25 % à l'Île-du-Prince-Édouard (Forzán *et al.*, 2010) et 25,7 % dans le Maine (Longcore *et al.*, 2007). Le champignon ne peut se développer lorsque la température de l'air est ≥ 28 °C; la prévalence de la maladie est donc généralement la plus faible en été et la plus élevée au printemps et à l'automne, lorsque les températures sont plus fraîches et que les amphibiens entrent dans leur habitat de reproduction ou d'hivernage (Voordouw *et al.*, 2010). Le risque d'infection par *Bd* est également plus élevé pour les espèces qui hibernent dans des habitats aquatiques plutôt que terrestres (Longcore *et al.*, 2007); il est donc important de surveiller les grenouilles pour détecter les signes de la maladie pendant l'hivernation artificielle en laboratoire. L'infection par *Bd* peut être détectée en analysant des échantillons d'écouvillons de l'abdomen ou des pieds par PCR. Les agents antifongiques peuvent tuer *Bd* dans les élevages, mais l'effet sur le têtard, le jeune et l'adulte infectés varie en termes de guérison (Johnson *et al.*, 2003; Densmore et Green, 2007).

Une autre maladie observée chez *L. pipiens* est connue sous le nom de maladie des pattes rouges (v. figure E.4), qui est le plus souvent associée à un agent pathogène bactérien appelé *Aeromonas hydrophila*. Le symptôme le plus courant est l'érythème; cependant, d'autres signes cliniques peuvent inclure l'anorexie, le gonflement, l'œdème ou les épanchements coelomiques, ainsi que les érosions épidermiques, les ulcères, la desquamation ou la nécrose. Cette maladie est le plus souvent mortelle et peut se manifester par une mort subite avec peu de signes cliniques, voire aucun (Densmore et Green, 2007). On peut traiter la maladie des pattes rouges avec des antibiotiques à large spectre.

La saprolégniose, ou moisissure aquatique commune, est associée à *Saprolegnia ferax* ou à *S. parasitica*. Cette maladie peut entraîner une mortalité importante des œufs et, chez les larves, elle se manifeste par l'apparition externe de colonies fongiques dont la texture est duveteuse ou cotonneuse. Une peau érythémateuse ou ulcérée peut également être visible, atteignant le plus souvent la queue, les membres postérieurs, les branchies et les muqueuses orales (Densmore et Green, 2007). Le traitement par divers agents antifongiques s'est avéré efficace.

Les parasites helminthes sont également fréquents chez les grenouilles léopard. *Ribeiroia ondatrae* provoque des déformations des membres et une mortalité à différents stades de développement (COSEPAC, 2009).

Les protozoaires et les nématodes sont les parasites les plus fréquemment observés dans les échantillons fécaux au LEEA. Les protozoaires ne nécessitent généralement pas de traitement, mais la présence de nématodes requiert l'utilisation d'un vermifuge.



Figure E.1 Réservoir d'élevage de grenouilles adultes avec une plateforme terrestre faite de roches de rivière (LEEA, 2004)



Figure E.2 Réservoir d'élevage de grenouilles adultes avec plateforme terrestre en plexiglas, pendant l'alimentation



Figure E.3 Exemples de motifs de taches chez les grenouilles léopards adultes (LEEA, 2004)



Figure E.4 Grenouille atteinte de la maladie des pattes rouges (LEEA, 2004). La coloration rouge des pattes et de l'abdomen est beaucoup plus vive que la légère rougeur associée à la manipulation des grenouilles.

E.2.4 Antécédents concernant les épidémies, les problèmes de santé des adultes et les traitements au LEEA¹²⁴

À plusieurs reprises, le LEEA a fait face à une épidémie, y compris lors de deux hibernations. Lorsque l'on procède au traitement des grenouilles malades, on soigne toujours les grenouilles présentant le moins de symptômes en premier.

- Des symptômes semblables à ceux de la maladie des pattes rouges ont été observés et certains de ces animaux sont morts. La chytridiomycose (causée par l'agent *Bd*) a été identifiée lors de l'examen pathologique dans un cas. On a procédé à des injections d'amikacine dans la patte arrière pendant sept jours, mais moins de la moitié des grenouilles ont survécu. Lors d'un événement ultérieur sans rapport, on a assisté à la mort massive de spécimens métamorphes de *L. pipiens* en raison de la présence de chytrides. La mortalité est survenue environ six semaines après la métamorphose des animaux. Ces animaux ont été élevés en laboratoire depuis qu'ils étaient de jeunes têtards. Cependant, les têtards peuvent ne pas présenter de signes cliniques de chytrides en raison de l'absence de kératine. On a administré un traitement consistant en un bain d'itraconazole de 5 minutes pendant 10 jours consécutifs, qui s'est avéré efficace; les essais ultérieurs par prélèvement d'écouvillons se sont révélés négatifs et la mortalité a cessé.
- La présence d'*Aeromonas hydrophila* a été identifiée à plusieurs reprises. À une occasion, on a pu observer une mortalité massive chez les nouveaux spécimens métamorphes après leur transfert dans l'habitat mixte. Des injections intramusculaires d'enrofloxacin (Baytril®) à 10 µg/g pendant sept jours consécutifs ont constitué un traitement efficace.
- La présence de *Mycobacterium marinum* a été détectée dans un réservoir présentant une mortalité élevée au LEEA. Comme il n'existe pas de traitement pour cette maladie, les autres animaux d'essai ont été euthanasiés. Le ranavirus a également été identifié chez les grenouilles qui ont reçu un résultat positif au test de dépistage de *Mycobacterium marinum*.
- Deux incidents de prolapsus cloacal léger (prolapsus du tissu rectal ou cloacal) se sont produits chez une grenouille adulte et ont été réparés par le personnel du laboratoire selon les modes opératoires décrits dans Wright et Whitaker (2001). Cela peut être dû à une hypocalcémie, à un impact gastrointestinal ou à une obstruction; la cause n'a pas été déterminée. Il s'agit d'un problème connu chez les amphibiens, mais il est rare qu'il se produise en laboratoire.

¹²⁴ Les renseignements de cette section proviennent du LEEA (2004, 2006, 2009).

Modes opératoires pour l'hibernation et l'élevage en laboratoire des spécimens adultes de *Lithobates pipiens*

F.1 Contexte

Les modes opératoires décrits dans cette annexe sont basés sur ceux élaborés par le D^r Vance Trudeau et affinés par le LEEA. Le mode opératoire du D^r Trudeau comprend une période d'hibernation artificielle suivie d'une injection combinée d'hormones et de neurotransmetteurs, à savoir un agoniste de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH-A) et du chlorhydrate de métopropramide (MET; un antagoniste de la dopamine), appelée méthode AMPHIPLEX (Trudeau *et al.*, 2010, 2013; Vu *et al.*, 2017). Une deuxième itération de la méthode a incorporé une dose unique d'amorçage de GnRH-A administrée à chaque grenouille 24 heures avant l'injection combinée de GnRH-A/MET (Trudeau *et al.*, 2013). Il en a résulté un taux de fécondation élevé et une viabilité des œufs en dehors de la saison de reproduction naturelle, un résultat qui a été reproduit dans deux laboratoires dans le cadre de la validation de la méthode d'essai d'Environnement et Changement climatique Canada (Nautilus Environmental, 2016; LEEA, 2018). La méthode AMPHIPLEX a été utilisée pour induire avec succès la reproduction chez *L. pipiens* et fournir des organismes d'essai pour un certain nombre d'études publiées (Melvin et Trudeau, 2012a; Leduc *et al.*, 2016; Milotic *et al.*, 2017; Robinson *et al.*, 2019; Young *et al.*, 2020). D'autres modes opératoires d'hibernation et de reproduction artificiels, ou des variantes de ceux prévus dans le présent document, peuvent également être utilisés pour produire des larves de *L. pipiens* retenues comme organismes d'essai pour la présente méthode d'essai d'Environnement et Changement climatique Canada, à condition que les organismes d'essai satisfassent aux critères sanitaires décrits au § 2.3.8. Les modes opératoires décrits dans cette annexe suivent de près ceux qui ont été utilisés avec succès par le LEEA et Nautilus Environmental.

F.2 Protocole d'hibernation

1. On peut prélever des adultes mâles et femelles de *L. pipiens* sur le terrain ou les commander auprès d'un fournisseur commercial. Il faudrait utiliser plus de mâles que de femelles, si possible; on recommande un rapport de trois mâles pour deux femelles (P. Jackman, Environnement et Changement climatique Canada, Moncton [Nouveau-Brunswick], communication personnelle, 2022)¹²⁵. Ne pas nourrir les adultes pendant les 48 heures précédant le transfert dans les réservoirs d'hibernation, afin de réduire les déchets métaboliques dans les réservoirs.

¹²⁵ On a mené des essais de reproduction avec des rapports variables de grenouilles mâles et femelles; cependant, on utilise généralement plus de grenouilles mâles que de grenouilles femelles pour induire des indices environnementaux (c.-à-d. la concurrence). Dans le cadre des essais de reproduction réalisés au cours de l'élaboration de la méthode d'Environnement et Changement climatique Canada, on a pu produire deux masses d'œufs viables en utilisant huit grenouilles léopards femelles et 19 grenouilles léopards mâles (Nautilus Environmental, 2016), et cinq masses d'œufs viables en utilisant 11 grenouilles léopards femelles et 17 grenouilles léopards mâles (LEEA, 2018). Les résultats de l'élevage artificiel décrits dans la documentation comprennent 11 masses d'œufs produites par 12 grenouilles léopards femelles et 16 grenouilles léopards mâles (Trudeau *et al.*, 2013).

2. Préparer les réservoirs d'hibernation dans une pièce à température contrôlée ou dans une chambre de croissance en ajoutant des plantes en plastique et des rochers ou des plats en verre inversé dans des récipients en plastique de 20 L (v. fig. F.1). Remplir les récipients à moitié avec de l'eau déchlorée ou une solution de Ringer diluée à 1:20¹²⁶, et ajouter des pierres poreuses d'aquarium du commerce et un thermomètre dans chacun d'eux.
3. Transférer les grenouilles adultes dans des réservoirs d'hibernation, avec un maximum de six grenouilles par contenant de 20 L. Les mâles et les femelles devraient être maintenus dans des réservoirs séparés pendant toute la durée de l'hibernation. Les grenouilles ne sont pas nourries pendant l'hibernation.
4. Mettre en place le calendrier d'éclairage et de température pour commencer l'hibernation (tableau F.1). Le calendrier recommandé de 62 jours a été utilisé avec succès par le LEEA (2018); cependant, des calendriers d'hibernation de différentes durées (30, 38, 41, 50, 62 et 76 jours) ont également été utilisés avec succès dans différents laboratoires (Trudeau *et al.*, 2010, 2013; Nautilus Environmental, 2016; LEEA, 2018).
5. On peut utiliser des systèmes de renouvellement intermittent ou continu pendant l'hibernation. S'il s'agit d'un renouvellement intermittent, effectuer un renouvellement de ≥ 50 % de la solution dans les réservoirs d'hibernation tous les jours pendant les deux premières semaines d'hibernation, et trois fois par semaine pour chaque semaine suivante. Minimiser les perturbations pour les grenouilles lors du renouvellement de la solution. S'il s'agit d'un renouvellement intermittent, placer la solution de renouvellement aérée dans la pièce à température contrôlée ou la chambre de croissance pour s'assurer qu'elle est à la bonne température avant d'être ajoutée aux réservoirs d'hibernation. S'il s'agit d'un renouvellement continu, assurer un faible débit continu dans chaque réservoir, avec un taux de remplacement de la solution approximativement égal à celui recommandé pour le renouvellement intermittent; si nécessaire, éliminer régulièrement les déchets solides et les débris en les aspirant. Maintenir une aération douce et continue dans chaque réservoir pendant toute la durée de l'hibernation. Mesurer quotidiennement la température de l'air et de la solution. Mesurer l'oxygène dissous et le pH des solutions nouvelles et anciennes pour chaque réservoir d'hibernation au moment du renouvellement, ou au moins trois fois par semaine s'il s'agit d'un renouvellement continu. Le contrôle de l'ammoniac est facultatif; les grenouilles n'étant pas nourries pendant l'hibernation, on suppose que les déchets métaboliques sont minimes. Vérifier quotidiennement la mortalité et les signes de stress ou de maladie dans chaque réservoir.
6. Ajuster la photopériode et la température en fonction du calendrier d'hibernation.

¹²⁶ Trudeau *et al.* (2010) ont maintenu des grenouilles dans une solution de Ringer diluée (dilution 1:20 de 0,1 M NaCl, 1,8 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ et 300 mg/L NaHCO₃ dans l'eau) pendant l'hibernation et la reproduction; cependant, on a approfondi la méthode AMPHIPLEX en utilisant de l'eau déchlorée (Trudeau *et al.*, 2013; Vu *et al.*, 2017). L'eau déchlorée a été utilisée avec succès pour l'hibernation et la reproduction dans deux laboratoires au cours de l'élaboration de la méthode (Nautilus Environmental, 2016; LEEA, 2018).

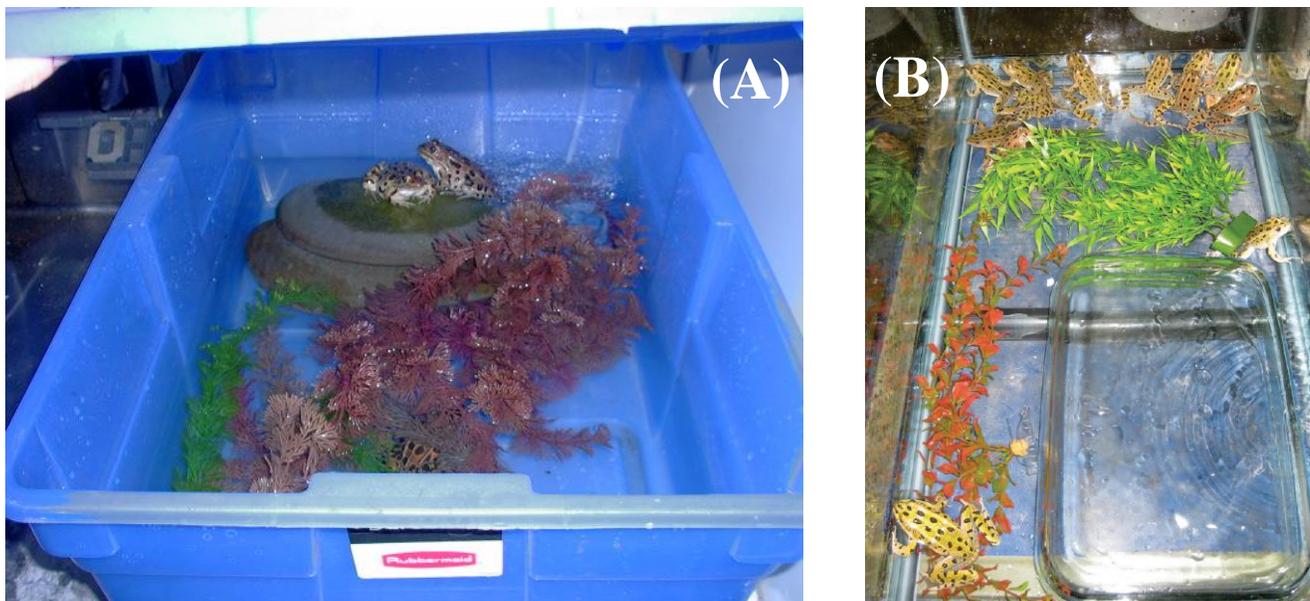


Figure F.1 Exemples de réservoirs d’hibernation avec des plantes en plastique, des plats en verre inversé ou des roches, et de l’eau déchlorée (A : LEEA, 2004; B : Nautilus Environmental, 2016 [à noter qu’une densité de chargement plus élevée que celle recommandée dans le protocole final a été utilisée dans cette étude]).

Tableau F.1. Cycle de lumière et de température pendant l’hibernation (LEE, 2018).

Jour	Température (°C)	Lumière allumée	Lumière éteinte	Lumière (h):obscurité (h)
1	15	6 h 30	19 h 30	13:11
2	13	6 h 30	19 h 30	13:11
3	11	7 h	19 h	12:12
4	9	7 h	19 h	12:12
5	8	7 h	19 h	12:12
6	7	7 h	19 h	12:12
7	5	7 h 30	18 h 30	11:13
8-9	3	7 h 30	18 h 30	11:13
10-12	3	8 h	18 h	10:14
13-15	3	8 h	17 h	9:15
16-52	3	8 h	17 h 30	9.5:14.5
53	6	8 h	18 h	10:14
54	6	7 h 30	18 h	10.5:13.5
55	6	7 h	19 h	12:12
56-58	8	6 h 30	20 h	13.5:10.5
59-60	10	6 h	21 h	15:9
61	13	6 h	22 h	16:8
62*	15	6 h	22 h	16:8

*Les grenouilles reçoivent une dose d’amorçage de GnRH-A ce jour-là. Les grenouilles sortent de l’hibernation le lendemain, reçoivent une injection de GnRH-A/MET et sont transférées dans des réservoirs de reproduction.

F.3 Protocole d'injection pour la reproduction

Toutes les injections décrites dans ce protocole sont intrapéritonéales et réalisées à l'aide d'aiguilles de calibre 26 et de seringues jetables de 1 mL (fig. F.2); chaque aiguille ne devrait être utilisée qu'une seule fois, car elle s'émousse rapidement (CCPA, 2021). Toutes les injections et manipulations d'animaux sont effectuées conformément aux directives relatives aux soins des animaux (CCPA, 2021).

Produits chimiques :

- GnRH-A (des-Gly¹⁰, D-Ala⁶, sel d'acétate de Pro-NHEt⁹-LHRH; numéro de produit Bachem 4012028)
- MET (chlorhydrate de métoclopramide; sigma-Aldrich, numéro de produit M0763)
- Solution saline (stérile, qualité IV)

1. Préparer des réservoirs de reproduction dans une pièce à température contrôlée ou une chambre de croissance (fig. F.3). Les réservoirs d'élevage devraient être de grande taille (p. ex. 150 L) avec une eau profonde (minimum ≥ 20 cm) et un couvercle. Les réservoirs de reproduction devraient comporter une surface terrestre, telle qu'une plateforme en plexiglas, couvrant environ 25 % de la surface, ainsi qu'un substrat suffisant pour les sites de ponte, tel que des plantes en plastique couvrant environ 80 % de la surface de l'eau et des plantes supplémentaires munies d'un poids pour fournir un substrat à différentes profondeurs du réservoir. Les plantes en plastique peuvent être attachées à une ficelle et fixées à une plateforme d'un côté et à une roche de l'autre, afin que les plantes soient suspendues en haut et en bas de la colonne d'eau. On devrait placer une lumière rouge (v. § 2.4.2) au-dessus d'une surface pour permettre aux animaux de se prélasser.
2. Préparer des solutions mères de GnRH-A dans une solution saline le jour de l'utilisation (p. ex. le jour 62 du calendrier d'hibernation du tableau F.1) : par exemple, ajouter 2 mg de GnRH-A à 1 mL de solution saline pour préparer une solution mère de 2 000 $\mu\text{g/mL}$, puis ajouter 0,1 mL de cette solution mère à 19,9 mL de solution saline pour préparer une solution de 10 $\mu\text{g/mL}$. Vingt-quatre heures avant la fin de l'hibernation¹²⁷, après que la température a été amenée à 15 °C, peser chaque grenouille mâle et femelle et injecter une dose d'amorçage à chaque grenouille avec une injection de GnRH-A à 0,04 $\mu\text{g/g}$ de poids corporel (p. ex. pour une grenouille de 50 g, injecter 0,2 mL d'une solution mère de 10 $\mu\text{g/mL}$). Séparer les mâles et les femelles après la dose d'amorçage. Noter tout chant nuptial observé ou tout changement de comportement après avoir donné la dose d'amorçage.
3. Le lendemain (c.-à-d. à la fin de l'hibernation, 24 heures après avoir donné la dose d'amorçage), préparer une solution combinée avec des hormones en dissolvant 1,6 mg de GnRH-A et 40 mg de MET dans 20 mL de solution saline, ce qui équivaut à 80 $\mu\text{g/mL}$ de GnRH-A et 2 000 $\mu\text{g/mL}$ de MET. Injecter à chaque grenouille la solution combinée avec des hormones, afin que chaque grenouille reçoive 0,4 μg de GnRH-A/g de poids corporel et 10 μg de MET/g de poids corporel, afin d'induire la reproduction. Pour déterminer la quantité à injecter dans chaque grenouille, utiliser l'équation suivante :

$$\text{volume d'injection} = \frac{\text{poids de la grenouille en grammes} \times 0,4 \mu\text{g/g GnRHA}}{80 \mu\text{g/mL GnRHA}}$$

¹²⁷ Si elles sont collectées pendant la saison de reproduction et que les adultes sont prêts à se reproduire, on peut également faire reproduire les grenouilles léopards peu de temps après leur arrivée au laboratoire (c.-à-d. sans hibernation). Les femelles et les mâles adultes sont conservés dans des réservoirs séparés. Les grenouilles devraient être mises en quarantaine, acclimatées, abritées et nourries tel qu'il est décrit précédemment. Après les injections d'hormones, les grenouilles sont transférées dans de grands réservoirs de reproduction adaptés à la ponte, tel que le décrit l'annexe F.3. Trudeau *et al.* (2013) décrivent un exemple de reproduction saisonnière réussie induite par des injections d'hormones en laboratoire avec des *L. pipiens* collectés sur le terrain.

Par exemple, une grenouille de 50 g nécessite une injection de 0,25 mL. Comme la solution combinée avec des hormones contient également 2 000 µg/mL de MET, cette grenouille recevrait 500 µg de MET, ce qui équivaut à la concentration souhaitée de 10 µg/g de poids corporel.

4. Une fois les injections terminées, transférer les grenouilles dans des réservoirs de reproduction dans la pièce ou la chambre à température contrôlée, avec un maximum de dix grenouilles par réservoir; on recommande un rapport de trois mâles pour deux femelles (P. Jackman, Environnement et Changement climatique Canada, Moncton [Nouveau-Brunswick], communication personnelle, 2022). La température est maintenue à 15 °C, avec une photopériode de 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité. Les grenouilles ne sont pas nourries pendant la reproduction.

F.4 Protocole d'élevage et de collecte des œufs

1. Le comportement des grenouilles dans les réservoirs de reproduction fait l'objet d'une observation quotidienne. Les incidences observées des chants nuptiaux, le nombre de paires en amplexus (fig. F.4) et le nombre de masses d'œufs (fig. F.5 et F.6) sont consignés quotidiennement pour chaque réservoir. Éviter les perturbations et une surveillance excessive, car les grenouilles semblent préférer les environnements peu actifs pour se reproduire.
2. Lorsque l'amplexus n'est plus observé et que toutes les masses d'œufs sont pondues (généralement deux à cinq jours après la dernière injection d'hormones), les masses d'œufs sont transférées dans des récipients aérés (v. § 2.3.2 et 2.3.5, et la fig. F.5). Les masses d'œufs fécondés peuvent être maintenues à des températures plus fraîches (p. ex. de 10 à 15 °C) pendant cinq semaines au maximum pour retarder le développement, si elles n'ont pas à être utilisées immédiatement dans un essai de toxicité (v. § 2.3.4).
3. Enregistrer le nombre approximatif d'œufs dans chaque masse d'œufs (généralement plusieurs centaines à plus d'un millier d'œufs par masse d'œufs). En cas de renouvellement intermittent, remplacer 50 % de l'eau de chaque réservoir au moins trois fois par semaine; les masses d'œufs doivent rester immergées pendant les renouvellements. Les mesures de la température, du pH et de l'oxygène dissous devraient être effectuées lors du renouvellement de l'eau. Les masses d'œufs devraient être surveillées quotidiennement pour détecter tout signe de maladie, de champignon ou de stress. Le taux de fécondation approximatif (%) devrait être consigné. Lors de la première ponte, les œufs sont à moitié noirs (pôle animal) et à moitié blancs (pôle végétatif); si les œufs sont fécondés, la couleur noire se propage et les œufs deviennent complètement noirs en 24 heures environ (fig. F.6). Il n'est pas rare qu'une partie de la masse d'œufs ne soit pas fécondée.
4. Une fois que les têtards ont éclos et qu'ils nagent, ils sont transférés dans des récipients aérés (v. § 2.3.2 et 2.3.5) et le nombre approximatif de têtards est consigné. La température peut ensuite être augmentée à raison de ≤ 3 °C/jour jusqu'à ce qu'elle atteigne la température d'essai (23 ± 2 °C). Les autres conditions d'élevage (alimentation, qualité de l'eau, manipulation, etc.) sont décrites au § 2.3.



Figure F.2. Injection intrapéritonéale de GnRH-A/MET chez les grenouilles adultes de *L. pipiens* pour induire la reproduction (LEEA, 2018).

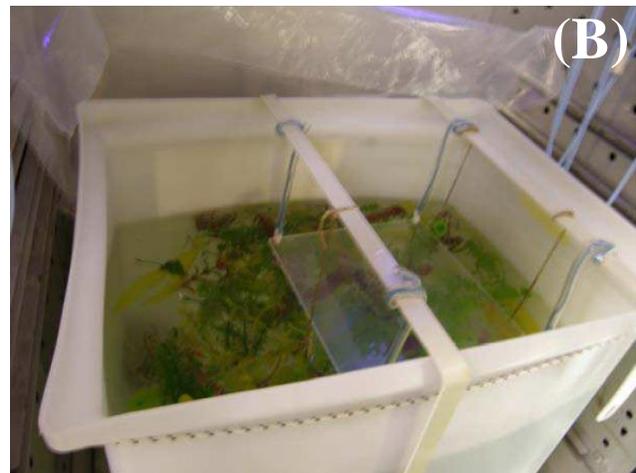


Figure F.3 Exemples de réservoirs de reproduction de 150 L pour *L. pipiens*, avec des plateformes terrestres surélevées et des plantes en plastique à différents niveaux de la colonne d'eau pour servir de substrat de reproduction (A : LEEA, 2009, B : LEEA, 2018).

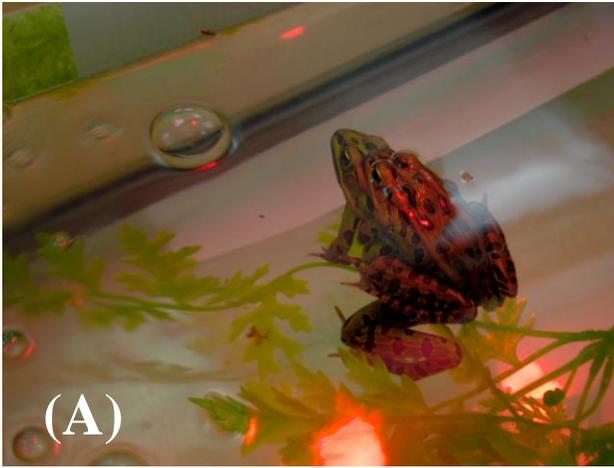


Figure F.4 Grenouilles en amplexus (A : LEEA, 2004, B : LEEA, 2018).

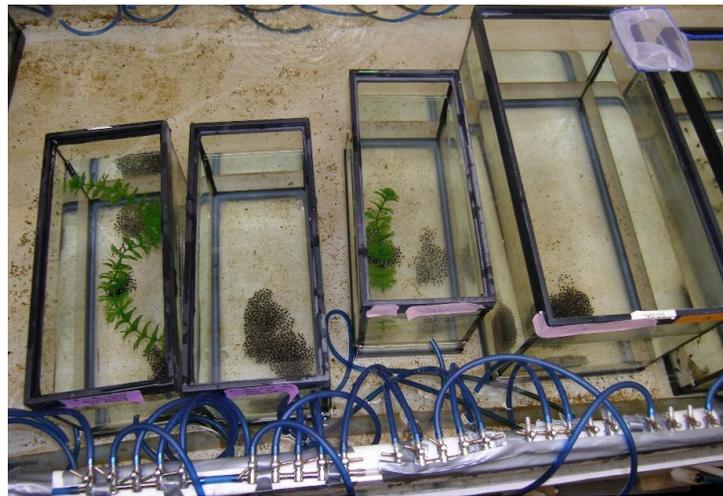


Figure F.5 Masses d'œufs de *L. pipiens* dans des contenants de maintien (LEEAA, 2009).

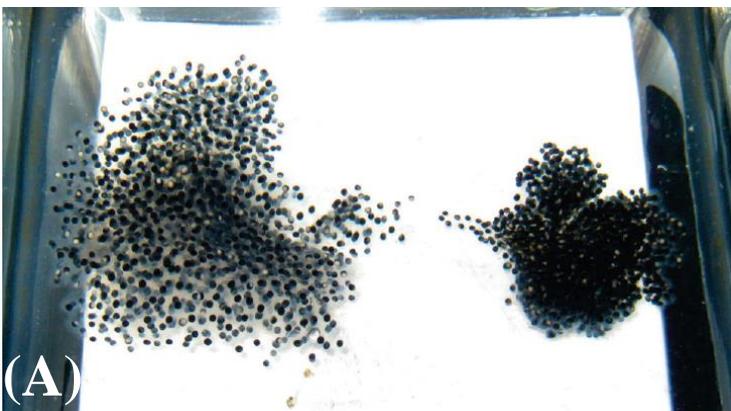


Figure F.6 Masses d'œufs de *L. pipiens* (A : Nautilus Environmental, 2016; B : LEEA, 2004).

Annexe G

Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais de toxicité¹²⁸

Colonne (nombre de concentrations entre 10,0 et 1,00 ou entre 1,00 et 0,10)¹²⁹

1	2	3	4	5	6	7
10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
3,2	4,6	5,6	6,3	6,8	7,2	7,5
1,00	2,2	3,2	4,0	4,6	5,2	5,6
0,32	1,00	1,8	2,5	3,2	3,7	4,2
0,10	0,46	1,00	1,6	2,2	2,7	3,2
	0,22	0,56	1,00	1,5	1,9	2,4
	0,10	0,32	0,63	1,00	1,4	1,8
		0,18	0,40	0,68	1,00	1,3
		0,10	0,25	0,46	0,72	1,00
			0,16	0,32	0,52	0,75
			0,10	0,22	0,37	0,56
				0,15	0,27	0,42
				0,10	0,19	0,32
					0,14	0,24
					0,10	0,18
						0,13
						0,10

¹²⁸ Adapté de Rocchini *et al.* (1982).

¹²⁹ Dans une colonne, on peut choisir une série de concentrations consécutives. Les points médians entre les concentrations de la colonne x se trouvent dans la colonne $2x + 1$. Les valeurs peuvent représenter des concentrations exprimées en pourcentage massique (p. ex. mg/kg) ou volumique (p. ex. mg/L). Au besoin, on peut les multiplier ou les diviser par toute puissance de 10. La colonne n° 2, avec ses deux ordres de grandeur, pourrait être utilisée si le degré de toxicité est entaché de beaucoup d'incertitude. On ne devrait pas utiliser de concentrations plus largement espacées, car cela diminue le degré de résolution des limites de confiance de toute valeur seuil calculée. Les valeurs plus rapprochées des colonnes 4 à 7 peuvent parfois être utiles pour les essais sur des substances chimiques dont l'effet de seuil est abrupt.