

1989/90/1226 Elaboration de lignes
directrices sur l'évaluation de la
toxicité des pesticides pour la végétation
non visée

242861

C-4
ETX-16

16665
REF-712
ETX-16

**ÉLABORATION DE LIGNES DIRECTRICES SUR L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ
DES PESTICIDES POUR LA VÉGÉTATION NON VISÉE**

par

Stella Swanson et Hans Peterson

Conservation et Protection
Environnement Canada

CENTRE DE DOCUMENTATION CSL
105, McGill, 2ième étage
Montréal (Québec) H2Y 2E7
Tél.: (514) 283-2762
Fax: (514) 283-7168

Section Édition

Édition française: Module d'édition française
Centre Saint-Laurent
C et P, Environnement Canada
Montréal (Québec) H2Y 2E7

Pour obtenir d'autres exemplaires du présent document, s'adresser à:

Division du transfert de la technologie et de la formation
Direction du développement technologique et des services techniques
Conservation et Protection
Environnement Canada
Ottawa (Ontario) K1A 0H3

This report is also available in English.

RÉSUMÉ

Les plantes constituent l'élément moteur des écosystèmes. Elles fournissent non seulement l'énergie nécessaire aux autres constituants, mais en outre, elles servent d'habitat à des organismes très divers, allant des microorganismes aux grands mammifères. Tout effet nuisible, même léger, sur ce constituant fondamental peut avoir de vastes répercussions. Les préoccupations actuelles au sujet de l'écotoxicité des pesticides, à court et à long termes, ont donné naissance au présent rapport qui contient entre autres:

a) un examen de la réglementation actuelle ainsi que des lignes directrices des organismes internationaux relatives aux essais d'écotoxicité sur les plantes;

b) une évaluation de la réglementation à partir de discussions avec les responsables des organismes appropriés pour déterminer si l'on a mis en évidence des problèmes liés à cette dernière;

c) un aperçu de la documentation et l'opinion d'experts en phytotoxicité sur la portée, la reproductibilité, les avantages et les inconvénients, et la disponibilité des différentes options pour chaque méthode expérimentale;

d) un examen des lacunes des exigences d'évaluation élaborées par d'autres organismes et une évaluation de la disponibilité, de la portée et de la reproductibilité des essais;

e) des conclusions et des recommandations pour l'élaboration de lignes directrices sur l'évaluation de la végétation non visée au Canada.

ABSTRACT

Plants are the basic engines of ecosystems providing available energy for all other components. Furthermore, plants provide a habitat for a wide variety of organisms, from microorganisms to large mammals. Damage to this fundamental component, however subtle, can have widespread repercussions. Concern about short- and long-term ecological effects of pesticides was the impetus for this report. The objectives of this report are to:

a) review and summarize the current regulations and plant testing guidelines of international agencies;

b) evaluate these regulations by contacting officials in the appropriate agencies to determine if problems with the regulations had been identified;

c) conduct a literature search and consult with phytotoxicity experts to report on scope, reproducibility, advantages/disadvantages and availability of alternatives for each test;

d) identify gaps in the testing requirements of other agencies and evaluate the availability, scope and reproducibility of tests that address these gaps; and

e) provide conclusions and recommendations for the development of non-target plant testing guidelines in Canada.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	III
Abstract	IV
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	IX
1 INTRODUCTION	1
2 RÉGLEMENTATION ACTUELLE DES ORGANISMES INTERNATIONAUX	3
2.1 Problèmes liés à la réglementation actuelle	6
2.2 Évaluation des essais actuels et des essais en cours d'élaboration	9
2.3 Examen de la documentation sur les essais existants et sur les essais en cours d'élaboration	12
2.3.1 Essais sur les algues	12
2.3.2 Essais sur les plantes vasculaires	13
2.3.3 Méthodes d'évaluation en microcosme, en mésocosme et sur le terrain	15
2.4 Lacunes à combler en matière d'évaluation de la phytotoxicité	15
3 EXIGENCES ACTUELLES RELATIVES À L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES PESTICIDES POUR LA VÉGÉTATION NON VISÉE	17
3.1 Agriculture Canada	17
3.2 Environmental Protection Agency des États-Unis (EPA)	17
3.2.1 Plantes non visées d'une "zone visée"	18
3.2.2 Plantes non visées d'une "zone non visée"	19
3.2.3 Exemples de plantes non visées pour lesquelles l'EPA des É.-U. a exigé une évaluation	27
3.3 OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques)	30
3.3.1 Algues, essais d'inhibition de la croissance	32
3.3.2 Plantes terrestres, essais d'inhibition de la croissance	35
3.4 Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation du Royaume-Uni	36
3.5 Ministère de l'Industrie primaire de l'Australie	38
3.6 Organisation internationale de normalisation (ISO)	39
3.7 Japon: loi concernant la réglementation des produits chimiques agricoles	40
3.8 Communauté économique européenne (CEE)	42

VI

3.9	Résumé des exigences	42
4	PROBLÈMES LIÉS À LA RÉGLEMENTATION ACTUELLE	43
4.1	EPA des É.-U.	43
4.1.1	Choix des espèces	43
4.1.2	Choix de la dose	44
4.1.3	Passage d'une étape d'essais à l'autre	45
4.1.4	Taille de la population	47
4.1.5	Observations générales	48
4.2	Lignes directrices de l'OCDE	48
4.3	Communauté économique européenne	51
4.4	Agence nationale pour la protection de l'environnement (Danemark)	52
4.5	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)	52
5	ÉVALUATION DES ESSAIS UTILISÉS DANS LES PRÉSENTES LIGNES DIRECTRICES	54
5.1	Commentaires des personnes interrogées	54
5.1.1	Portée des essais présentement employés	54
5.1.2	Reproductibilité des essais	55
5.1.3	Avantages et inconvénients des présents essais	56
5.1.4	Paramètres à évaluer préférés pour les essais de phytotoxicité	56
5.1.5	Suggestions "d'espèces indicatrices"	57
5.1.6	Opinions sur l'approche des essais par étapes	59
5.2	Comparaison des lignes directrices du FIFRA et de celles établies en vertu du TSCA	59
5.3	Évaluation des essais présentement employés et des essais de rechange	63
5.3.1	Essais toxicologiques pour les algues	63
5.3.2	Essais toxicologiques pour les plantes vasculaires	80
5.4	Méthodes d'évaluation en microcosme, en mésocosme et sur le terrain	92
5.4.1	Microcosmes	93
5.4.2	Mésocosmes	99
5.4.3	Études sur le terrain	103
5.4.4	Évaluation des méthodes de travail en microcosme, en mésocosme et sur le terrain	104
6	LACUNES DANS NOS CONNAISSANCES SUR LES ESSAIS DE PHYTOTOXICITÉ	114
6.1	Effets de mélanges de pesticides	114
6.2	Effets des produits de dégradation et des produits chimiques ajoutés aux mélanges commerciaux de pesticides	118

VII

6.3	Méthodes d'essais en microcosme et en mésocosme terrestres ainsi que sur le terrain	119
6.4	Méthodes d'essais normalisées en microcosme et en mésocosme aquatiques ainsi que sur le terrain	120
6.5	Méthodes d'extrapolation à partir des résultats d'essais normalisés pour l'évaluation des effets sur le terrain (évaluation des risques)	120
7	CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	126
7.1	Recommandations pour les lignes directrices canadiennes	126
7.1.1	Tout produit antiparasitaire	126
7.1.2	Pesticides utilisés en milieu aquatique et pesticides susceptibles de migrer vers des habitats aquatiques	126
7.1.3	Pesticides persistants susceptibles de pénétrer dans l'environnement aquatique	126
7.1.4	Essais sur le terrain	126
7.2	Recommandations pour les protocoles d'évaluation	127
7.2.1	Recommandations générales	127
7.2.2	Recommandations pour les essais sur les algues	127
7.2.3	Recommandations pour les essais sur des macrophytes aquatiques	128
7.2.4	Recommandations pour les essais sur les plantes vasculaires terrestres	128
7.2.5	Recommandations pour les essais en microcosme, en mésocosme et sur le terrain	128
7.3	Recommandations pour les recherches ultérieures et la mise au point d'essais	130
	Références	132
Annexe	Questionnaire sur les essais de détermination de la toxicité des pesticides pour les plantes non visées	145

VIII

LISTE DES TABLEAUX

1	Essais requis par différents organismes pour évaluer les effets de certaines substances sur la végétation non visée	7
2	Résultats des questionnaires d'évaluation des essais déjà existants et des essais en cours d'élaboration	10
3	Mesures proposées pour les essais de confirmation à la suite de l'évaluation des résultats obtenus au niveau de base, d'après les critères de transition	33
4	Méthodes pour la détermination de l'inhibition de la croissance des algues	74
5	Comparaison des plages de concentrations létales de produits chimiques pour divers organismes	82
6	Espèces utilisées pour des essais biologiques avec certains herbicides	85
7	Principales caractéristiques des microcosmes terrestres qui ont servi à l'étude du devenir et des effets de substances chimiques dans le milieu	100
8	Utilité des variables fonctionnelles pour la détection des effets nocifs importants de substances chimiques dans les modèles d'écosystèmes en laboratoire	112
9	Résumé de l'évaluation des essais de toxicité pour les plantes non visées	125

IX

LISTE DES FIGURES

1	Plan d'évaluation des dangers pour l'environnement	37
2	Marche à suivre pour l'homologation des pesticides au Japon	41
3	Répartition des espèces du Cd en fonction du pH. Quantité de Cd dissous total pour une inhibition à 50 p. 100 de l'assimilation du P chez <i>S. Quadricauda</i> , en fonction du pH. Logarithme négatif de la teneur en Cd dissous total qui provoque une inhibition à 50 p. 100 de l'assimilation de P en fonction du pH	66
4	Répartition des espèces du Cu dissous en fonction du pH. Quantité de Cu dissous total pour une inhibition à 50 p. 100 de l'assimilation du P chez <i>S. Quadricauda</i> , en fonction du pH. Logarithme négatif de la teneur en Cu et Cu^{2+} dissous totaux qui provoque une inhibition à 50 p. 100 de l'assimilation de P en fonction du pH	67

PX
C. C. C.

1 INTRODUCTION

Le présent rapport passe en revue les essais obligatoires existants pour l'évaluation de la toxicité des pesticides envers la végétation non visée et décrit les cas où les essais sont exigés ainsi que les normes d'évaluation et les protocoles expérimentaux utilisés.

Un questionnaire sur l'évaluation de la toxicité pour la végétation non visée a été préparé et envoyé à plus de 50 experts au Canada, aux États-Unis et en Europe (voir l'annexe). Ce questionnaire a servi de base aux discussions avec les responsables d'organismes internationaux sur les problèmes actuels liés à la réglementation et sur les modifications prévues ainsi que sur l'évaluation des essais présentement exigés.

Il a été ainsi possible d'identifier les lacunes des exigences d'évaluation et d'examiner les méthodes existantes qui pourraient combler ces lacunes.

Le présent rapport traite des pesticides en général, c'est-à-dire des herbicides, des fongicides et des insecticides. Par conséquent, les essais qui sont décrits et examinés, ainsi que les recommandations découlant de la présente étude, s'appliquent aux pesticides dans leur ensemble.

Avant d'aborder l'étude de la réglementation et des essais sur les plantes non visées, il serait utile de donner une définition de ce que l'on entend par plante "non visée". L'EPA des É.-U. est le seul organisme qui en donne une définition explicite: "Les plantes non visées incluent les cultures, les plantes ornementales et autres plantes qui sont traitées "accidentellement" soit par pulvérisation de produits ou par un autre moyen, ainsi que les plantes poussant en dehors de la zone où doit se faire l'application ou zone visée (ce qui pourrait comprendre les plantes qui servent d'aliment et d'abri aux animaux, les plantes alimentaires, les plantes textiles et les plantes ornementales utilisées par l'homme, ainsi que les plantes menacées d'extinction)" (Holst et Ellwanger, 1982). Ainsi, l'Environmental Protection Agency des États-Unis divise les espèces non visées en deux catégories, les plantes d'une "zone visée" (p. ex. les cultures) et les plantes d'une "zone non visée" (p. ex. le couvert végétal). Les essais exigés pour ces deux groupes sont différents (voir le chapitre 3).

Au Royaume-Uni et en Australie, les documents traitant des essais exigés ne définissent pas de façon précise les plantes non visées. Le ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation du Royaume-Uni (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food ou MAFF) n'emploie pas le terme "non visé" et n'exige pas une évaluation des effets sur toutes les espèces végétales, non visées ou autres (U.K. MAFF, 1984). En Australie, le

ministère de l'Industrie primaire (Department of Primary Industry) établit une distinction entre la phytotoxicité pour les cultures traitées et l'évaluation des risques pour "des cultures et des plantes non visées", mais il ne donne aucune définition d'une "plante non visée" (Australian DPI, 1985).

Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais des produits chimiques (Organisation de coopération et de développement économiques) ne catégorisent pas les organismes vivants pour l'évaluation. L'OCDE insiste plutôt sur l'importance de tenir compte de la structure du rôle des écosystèmes dans leur ensemble. Ainsi, cela sous-entend que les producteurs primaires devraient faire partie de tous les plans élémentaires d'évaluation écotoxicologique. Elle ne fait aucune recommandation spécifique au sujet des "plantes non visées"; cependant, les essais d'inhibition de la croissance des algues et des plantes terrestres font partie des "niveaux d'évaluation de base et de confirmation" de l'OCDE (OCDE, 1981).

Aux fins du présent rapport, toute plante poussant dans une zone non visée est considérée comme une plante non visée.

Il n'existe aucune norme canadienne spécifique qui s'applique à l'évaluation de la toxicité des pesticides pour des plantes non visées autres que des espèces d'intérêt agricole. On parle d'essais d'écotoxicité dans l'Annexe A du *Guide d'homologation d'Agriculture Canada*, intitulée "Données nécessaires à l'appui de la demande d'homologation" et qui couvre les circulaires à la profession T-1-237 à T-1-241. Les essais d'inhibition de la croissance des algues peuvent entrer dans la catégorie "organismes aquatiques" des essais d'écotoxicité, mais ils ne sont pas obligatoires. Aucun protocole n'est fourni pour les essais spécifiques.

L'Environmental Protection Agency des États-Unis (EPA) emploie un système en trois étapes pour évaluer les plantes non visées d'une "région non visée". La première étape, une évaluation élémentaire, est suivie d'une deuxième étape d'essais si au moins 25 p. 100 des sujets sont atteints (CE 25) dans le cas d'une ou de plusieurs espèces végétales terrestres ou si au moins 50 p. 100 des sujets (CE 50) sont atteints dans le cas d'une ou de plusieurs espèces végétales aquatiques, lorsqu'on effectue les essais à la dose maximale mentionnée sur l'étiquette du pesticide. Le passage à la troisième étape (essais sur le terrain) peut être requis dans certaines conditions, étudiées cas par cas (espèces terrestres), ou si l'on prévoit un effet supérieur à la CE 50 sur toute espèce végétale aquatique testée au cours de la deuxième étape, ou encore si l'on prévoit une contamination de l'eau à la suite d'un épandage direct du pesticide, d'un déversement direct d'eau traitée ou de l'emploi du pesticide en milieu forestier.

L'essai sur la végétation terrestre de la première étape consiste à déterminer l'inhibition de la germination des semences et(ou) celle de l'émergence des semis et la vigueur végétative de dix espèces traitées avec la dose maximale mentionnée sur l'étiquette ou avec trois fois la quantité maximale possible dans la région non visée. Il faut employer un produit de qualité technique. L'essai sur la végétation terrestre de la deuxième étape consiste à déterminer de façon plus poussée l'inhibition de la germination des semences, de l'émergence et de la vigueur des plantes en appliquant au moins cinq doses différentes du produit sur l'espèce présentant les effets phytotoxiques de la première étape. L'essai sur la végétation terrestre de la troisième étape consiste à évaluer sur le terrain dix espèces de monocotylédones, de dicotylédones, de cryptogames vasculaires, de bryophytes ou d'hépatiques et de gymnospermes, en utilisant les mêmes doses que celles de la deuxième étape mais avec un produit formulé. Les essais des deux premières étapes durent deux semaines; la durée des essais sur le terrain doit être

suffisante pour permettre l'évaluation des applications multiples indiquées sur l'étiquette; les observations doivent se poursuivre pendant au moins deux semaines après le dernier traitement et jusqu'à quatre semaines au plus pour que l'on puisse observer les effets du produit sur la végétation (récupération ou mort).

Les essais sur la végétation aquatique de la première étape consistent à évaluer l'inhibition de la croissance de quatre espèces d'algues (une chlorophycée, une diatomée d'eau douce, une diatomée marine et une cyanophycée) et l'inhibition de la croissance de *Lemna* (lenticule mineure). On emploie la dose maximale mentionnée sur l'étiquette ou trois fois la dose prévue du produit de qualité technique dans l'environnement, pendant cinq jours pour les algues et quatorze jours pour *Lemna*. Les essais de la deuxième étape consistent à traiter avec cinq doses différentes (minimum) toutes les espèces qui présentaient des effets toxiques à la première étape. Les essais de la troisième étape consistent en essais sur le terrain utilisant un produit formulé aux mêmes doses que celles de la deuxième étape. Il faut évaluer des espèces de monocotylédones, de dicotylédones, de cryptogames vasculaires, de chacune des différentes classes d'algues, de bryophytes ou d'hépatiques. Les essais doivent être suffisamment longs pour permettre l'évaluation des applications multiples indiquées sur l'étiquette du produit à l'étude, et les observations doivent se poursuivre pendant au moins deux semaines après le dernier traitement jusqu'à un maximum de quatre semaines pour que l'on puisse noter s'il y a eu récupération ou mort de la végétation aquatique.

L'EPA exige le plus souvent des essais sur des plantes non visées si le pesticide doit être employé dans une région abritant des espèces menacées d'extinction.

L'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) utilise également un système en trois étapes. Les critères pour dépasser la première étape incluent: persistance, bio-accumulation importante, CL 50 inférieure à 1 mg/l, niveau "sans effet" très bas ou absence de niveau "sans effet", mutagénèse, modification du volume de production, du type d'utilisation ou d'élimination du pesticide, accroissement de la toxicité en raison de modifications de l'environnement et concentrations sans effet observé inférieures à dix fois la concentration prévue dans l'environnement.

La première étape dite "de base" consiste à effectuer des essais simples pour trouver les effets possibles d'un pesticide sur quelques types d'organismes importants du point de vue fonctionnel. L'essai d'inhibition de la croissance algale, d'une durée de trois jours, est le seul essai sur des plantes non visées effectué au cours de cette étape. Il porte sur une espèce choisie dans une liste de trois espèces recommandées et utilise au moins cinq concentrations du produit à évaluer. Comme le système de l'OCDE sert à évaluer des

produits chimiques très différents (et non des pesticides seulement), on ne précise pas le type de pesticide utilisé (ingrédient actif, produit formulé).

La deuxième étape dite "de confirmation" comporte des essais plus précis qui vérifient les effets observés ou présumés lors de la première étape. Ces essais peuvent être reliés à un milieu spécifique ou à plusieurs milieux. Il faut tenir compte de l'exposition chronique et des voies spécifiques de contamination. L'OCDE propose des essais de croissance sur d'autres espèces d'algues ainsi que des essais utilisant la CL 50, des essais de croissance et de reproduction sur *Lemna* et sur d'autres espèces vasculaires aquatiques. Les essais sur la végétation terrestre doivent porter sur la germination, la croissance et le cycle biologique partiel tant des monocotylédones que des dicotylédones. L'essai de l'OCDE sur la croissance de plantes terrestres consiste à évaluer, à trois doses différentes, au moins trois espèces, chacune appartenant à l'une des trois catégories suivantes: céréales, choux et légumineuses ou laitue-cresson. La durée de l'essai ne doit pas être inférieure à quatorze jours après l'émergence de 50 p. 100 des semis témoins.

Il n'existe aucune règle fixe s'appliquant à la troisième étape dite "définitive" des essais décrits par l'OCDE, car ces essais n'ont pas été élaborés de façon complète. Ils entrent dans les catégories générales suivantes: essais sur des communautés naturelles vivant en milieu confiné; essais en aquarium sur des communautés artificielles; et essais en compartiments sur des niveaux trophiques distincts.

Le Ministry of Agriculture, Fisheries and Food du Royaume-Uni (U.K. MAFF) n'a pas de directives spécifiques au sujet de l'évaluation de la toxicité des pesticides pour des organismes non visés. Ce ministère dispose toutefois d'un plan pour évaluer les risques généraux que présente la contamination de plantes aquatiques non visées par des produits chimiques. Ce plan comporte cinq étapes dont chacune génère des données plus complexes. Le passage de l'étape initiale aux étapes suivantes dépend des "marges de sécurité" fixées pour la plupart des espèces sensibles de poissons, d'invertébrés et d'algues. On établit ces marges de sécurité en comparant la concentration sans effet à la CL 50 - 96 h pour l'organisme le plus sensible. Dans le cas de la plupart des produits chimiques, la teneur sans effet pour toutes les espèces est généralement supérieure au centième de la CL 50 - 96 h. Par conséquent, si le quotient de la CL 50 et de la teneur maximale de l'eau en substance chimique après utilisation normale est inférieur à 100, il faut alors procéder à des essais plus poussés. Les essais initiaux portent sur la préparation commerciale du produit. L'échelon le plus fondamental des essais consiste en essais de sélection. On peut ensuite rajouter des essais de toxicité aiguë pour l'ingrédient actif, des essais de toxicité chronique et des essais sur le cycle biologique, des études sur la

bio-accumulation et finalement des études contrôlées et partiellement contrôlées sur des écosystèmes.

Le Department of Primary Industry (DPI) de l'Australie a établi des règles relatives à la protection des plantes traitées et l'évaluation des dangers pour les cultures et les plantes non visées. Celles qui s'appliquent aux plantes et aux cultures non visées sont très générales. Une grande importance a été accordée aux effets causés par des traitements répétés et des produits chimiques persistants, des produits chimiques volatils, des produits chimiques sujets à bio-accumulation, des produits utilisés dans des voies navigables ou à proximité et des produits chimiques pulvérisés par voie aérienne ou par d'autres méthodes favorisant leur dispersion dans l'atmosphère.

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) fournit des protocoles d'essais normalisés permettant d'évaluer les produits chimiques en général. Le seul protocole s'appliquant aux plantes non visées est celui concernant l'inhibition de la croissance algale. L'essai porte sur une espèce (on recommande *Scenedesmus subspicatus* ou *S. capricornutum*) et utilise au moins cinq concentrations différentes du produit chimique. Il dure 72 heures.

Au Japon, la loi concernant la réglementation des produits chimiques agricoles prévoit des études de phytotoxicité. Cependant, les protocoles des essais requis n'ont pas encore été traduits.

La Communauté économique européenne (CEE) a publié une directive stipulant que les pays membres devront exiger l'homologation des produits antiparasitaires, exigence comprenant notamment au moins un essai d'inhibition de la prolifération algale. Cet essai est essentiellement le même que celui de l'OCDE, car nous n'avons pu établir de distinction entre les deux. L'essai portant sur des plantes supérieures est également basé sur la méthode de l'OCDE, mais on en évalue actuellement une variante améliorée.

Les essais requis par les différents organismes sont décrits au tableau 1.

2.1 Problèmes liés à la réglementation actuelle

Les représentants des organismes internationaux ont identifié trois points principaux qui posent des problèmes: le choix des espèces, le passage d'une étape d'évaluation à l'autre et l'absence de protocoles d'essai normalisés pour les plantes terrestres, les essais multi-espèces et les essais sur le terrain.

Le choix des espèces est le sujet le plus fréquemment mentionné par les organismes internationaux. Actuellement, l'évaluation des plantes aquatiques exige l'emploi de une à quatre espèces d'algues (dont *Selenastrum capricornutum* fait

TABLEAU 1 ESSAIS REQUIS PAR DIFFÉRENTS ORGANISMES POUR ÉVALUER LES EFFETS DE CERTAINES SUBSTANCES SUR LA VÉGÉTATION NON VISÉE

Type d'essai	EPA (É.-U.)			OCDE	R.-U.	Australie	CEE
	Étape 1	Étape 2	Étape 3				
Inhibition de la germination des semences et(ou) de l'émergence des semis	X	X	NR	X	NR	R	X
Vigueur végétative	O	O	NR	R	NR	R	R
Inhibition de la croissance d'algues	X	X	NR	X	NR	R	X
Inhibition de la croissance de plantes aquatiques vasculaires	O	O	NR	R	NR	R	R
Évaluation sur le terrain de plantes terrestres: germination des semences, vigueur, reproduction	NR	NR	X	R	NR	R	NR
Évaluation sur le terrain de plantes aquatiques: plantes vasculaires, algues, bryophytes	NR	NR	X	R	NR	R	NR

X: essai requis. O: essai peut être requis. NR: essai non requis. R: essai requis dans certains cas, mais sans indication précise.

habituellement partie) et une espèce de *Lemna*. Dans le cas des plantes terrestres, on demande généralement de choisir les espèces dans une liste d'espèces essentiellement commerciales. Il n'est pas toujours possible de se procurer les espèces recommandées; de plus, elles ne sont pas nécessairement représentatives des milieux vulnérables et elles ne sont pas toujours les plus sensibles au pesticide à l'étude. La sélection de cultivars dans une espèce présente souvent des difficultés. L'EPA des É.-U. insiste sur le choix d'espèces pour lesquelles il existe une base de données de toxicité et d'espèces qu'on peut se procurer dans le commerce, non menacées d'extinction et représentatives de l'environnement. L'OCDE recherche également des espèces qui ont déjà été largement utilisées au cours d'évaluations de la toxicité et qui sont représentatives de l'environnement. Cet organisme favorise activement la mise au point d'essais applicables à plusieurs espèces à la fois au lieu de se fier à des essais applicables à une seule espèce, effectués sur une ou deux espèces. Tant qu'il n'existe pas d'essais perfectionnés applicables à plusieurs espèces à la fois, l'OCDE affirme qu'il vaut mieux étudier plusieurs espèces avec une série d'essais au lieu "d'une évaluation très poussée portant sur une espèce seulement".

Les critères pour passer d'une étape à l'autre ont fait l'objet de nombreux commentaires et de nombreuses critiques. Ces critères peuvent être très spécifiques; par exemple, l'EPA des É.-U. exige qu'on expose à des valeurs seuils correspondant à la CE 50 ou à la CE 25 les plantes aquatiques et terrestres, respectivement, pour passer de la première étape à la deuxième étape. Les critères peuvent être très généraux, comme en témoigne la liste établie par l'OCDE pour passer du niveau de base au niveau de confirmation. Ces deux approches ont leurs inconvénients. Selon l'EPA et l'OCDE, il faut surtout faire preuve de discernement lorsqu'on évalue la nécessité de passer à l'étape suivante.

Tous les organismes que nous avons contactés sont préoccupés par l'absence de protocoles perfectionnés et largement éprouvés pour les essais sur des plantes terrestres, les essais multi-espèces et les essais sur le terrain. Il y a consensus général sur la nécessité de ces essais pour une évaluation complète des effets néfastes des pesticides. Cependant, l'état actuel des connaissances ne permet pas une évaluation sûre des mérites et des inconvénients de certains protocoles particuliers. Par conséquent, le nombre d'essais effectués sur des plantes terrestres, d'essais multi-espèces et d'essais sur le terrain varie beaucoup d'un organisme international à l'autre. L'EPA est le seul organisme dont la réglementation stipule des essais sur le terrain; toutefois, il est rare que des essais sur le terrain soient requis, et par conséquent, il est difficile d'en obtenir des résultats aux fins de l'étude.

2.2 Évaluation des essais actuels et des essais en cours d'élaboration

Résultats des questionnaires. - Des questionnaires ont été envoyés à 64 experts en phytotoxicité afin d'obtenir leurs commentaires sur les essais qui existent présentement et leurs suggestions pour les améliorer. Ces experts ont été choisis dans les domaines suivants: agriculture (gouvernement), environnement (gouvernement), environnement (milieu universitaire), foresterie (gouvernement), foresterie (milieu universitaire) et industrie. Le tableau 2 résume les réponses obtenues pour chacune de ces catégories.

Dans l'évaluation des essais existants, les experts étaient divisés de façon égale sur la question de la portée de ces essais. Certaines des personnes interrogées, estimant que la portée des essais était généralement suffisante, ont insisté sur l'importance du choix très attentif des espèces. Les personnes estimant que la portée des essais était insuffisante, se préoccupaient du nombre restreint des espèces évaluées et de la représentativité réelle des espèces recommandées. La sélection des souches au sein d'une même espèce était également un sujet de préoccupation. Les experts n'étaient généralement pas certains de la pertinence de ces essais pour l'évaluation de la toxicité sur le terrain.

Les essais actuels ont été jugés particulièrement inadéquats pour le milieu forestier.

La plupart des personnes interrogées ont trouvé que la reproductibilité des essais existants était bonne. Celles qui ont estimé que les essais étaient généralement satisfaisants ont toutefois ajouté certaines conditions, notamment: la nécessité d'un personnel expérimenté; l'importance de conditions rigoureusement contrôlées et d'une surveillance attentive; l'importance de cultures axéniques; et la nécessité de trouver une source normalisée totalement identifiée sur le plan taxonomique.

Les avantages des essais existants les plus fréquemment mentionnés étaient, par ordre de fréquence des réponses: l'économie, la simplicité, la reproductibilité, la rapidité, la sensibilité, le peu d'espace et le minimum de matériel requis. L'inconvénient le plus fréquemment mentionné était la nécessité d'extrapoler pour les conditions sur le terrain.

Les paramètres à évaluer recommandés pour les essais sur des espèces vasculaires variaient notablement selon les personnes interrogées. Le seul paramètre à obtenir l'unanimité était la mesure de la "croissance". Les experts ont proposé d'autres paramètres, notamment des facteurs physiologiques comme la fixation du CO₂, l'assimilation du carbone, le dégagement de O₂, la chlorophylle et les principaux systèmes

	Agriculture			Environnement			Foresterie									
	(gouvernement)			(gouvernement)			(milieu universitaire)			(gouvernement)	(milieu universitaire)	Indu				
Nombre de questionnaires envoyés	5			21			19			6	7	6				
Nombre de répondants	2			10			6			3	3	2				
1. Essais existants (EPA, OCDE, etc.)	Ad.	Éq.	Inad.	Ad.	Éq.	Inad.	Ad.	Éq.	Inad.	Ad.	Éq.	Inad.	Ad.			
- Portée	1	1		5	3		1	4		3	0		2			
- Reproductibilité	2	0		5	0		4 ^b	1		1	0		2 ^b			
- Avantages et désavantages ^c	1	0		7	1	0	2	1	1	0	1	0	1			
2. Paramètres évalués	Germination, croissance			Croissance, production primaire, mortalité, germination			Croissance, paramètres physiologiques, morphologie			Après la germination			Mort ou nécrose, survie, croissance	Ger cro' dév		
3. Espèces indicatrices ^d	Cultures sensibles, espèces régionales			Algues (> 1 espèce)*; macrophytes (Lemna et autres)*; conifères, feuillus; cultures commerciales; monocotylédones, dicotylédones*			Algues (> 1 espèce)*; macrophytes (> 1 espèce)*; espèces cultivées; conifères, feuillus			Principaux arbres de peuplements finals, principaux arbres ou arbrisseaux sans valeur commerciale, espèces visées par le pesticide			Conifères (> 1 espèce); dicotylédones (> 1 espèce); espèces broutées, clées; espèces cultivées clées; espèces agricoles connexes			Aur d'es pro des
4. Approche par étapes	Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre	Pat	
	1	0		6	1		3	0		1	1		1	1		
5. Essais multi-espèces inclus dans les lignes directrices:	Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre	Pou	
- Essais sur le terrain	2	0		6 ^b	0		3	3		2	0		2 ^b	0		2
- Mésocosmes	0	0		3 ^b	2		5 ^b	1		1 ^b	1		0	1		1 ^b
- Ensemble d'espèces	0	0		7	0		6 ^b	0		3 ^b	0		0	1 ^b		1 ^b

^a Les personnes interrogées n'ont pas répondu à toutes les questions.

^b Plusieurs conditions jointes.

^c Ad. (adéquats): les avantages l'emportent sur les inconvénients.
Éq. (équivalents): les avantages et les inconvénients s'équilibrent.
Inad. (inadéquats): les inconvénients l'emportent sur les avantages.

^d Liste de toutes les suggestions (celles qui sont mentionnées plus d'une fois sont suivies d'un *).

Tableau 2 p. 10 55%

	Agriculture			Environnement			Foresterie											
	(gouvernement)			(gouvernement)			(milieu universitaire)			(gouvernement)			(milieu universitaire)			Industrie		
Nombre de questionnaires envoyés	5			21			19			6			7			6		
Nombre de répondants	2			10			6			3			3			2		
Essais existants (EPA, OCDE, etc.)	Ad.	Éq.	Inad.	Ad.	Éq.	Inad.	Ad.	Éq.	Inad.	Ad.	Éq.	Inad.	Ad.	Éq.	Inad.	Ad.	Éq.	Inad.
- toxicité	1		1	5		3	1		4	3		0	1		2	2		0
- reproductibilité	2		0	5		0	4 ^b		1	1		0	2		0	2 ^b		0
- avantages et désavantages ^c	1		0	7	1	0	2	1	1	0	1	0	0	1	2	1		0
Paramètres évalués	Germination, croissance			Croissance, production primaire, mortalité, germination			Croissance, paramètres physiologiques, morphologie			Après la germination			Mort ou nécrose, survie, croissance			Germination, croissance, développement		
Essais inclus dans les lignes directrices ^d	Cultures sensibles, espèces régionales			Algues (> 1 espèce)*; macrophytes (<i>Lemna</i> et autres)*; conifères, feuillus; cultures commerciales; monocotylédones, dicotylédones*			Algues (> 1 espèce)*; macrophytes (> 1 espèce)*; espèces cultivées; conifères, feuillus			Principaux arbres de peuplements finals, principaux arbres ou arbrisseaux sans valeur commerciale, espèces visées par le pesticide			Conifères (> 1 espèce); dicotylédones (> 1 espèce); espèces broutées; espèces cultivées; espèces agricoles connexes			Aucun besoin d'espèces "canadiennes" propres à un site; des cas particuliers		
Approche par échantillonnage	Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre		Pas d'opinion		
	1	0		6	1		3	0		1	1		1	1				
Essais multi-espèces inclus dans les lignes directrices:	Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre		Pour	Contre	
- sur terrain	2	0		6 ^b	0		3	3		2	0		2 ^b	0		2	Besoins de recherches plus poussées	
- soccosmes	0	0		3 ^b	2		5 ^b	1		1 ^b	1		0	1		1 ^b	0	
- ensemble d'espèces	0	0		7	0		6 ^b	0		3 ^b	0		0	1 ^b		1 ^b	0	

Les personnes interrogées n'ont pas répondu à toutes les questions.
Plusieurs conditions jointes.
Ad. (adéquats): les avantages l'emportent sur les inconvénients.
Éq. (équivalents): les avantages et les inconvénients s'équilibrent.
Inad. (inadéquats): les inconvénients l'emportent sur les avantages.
Liste de toutes les suggestions (celles qui sont mentionnées plus d'une fois sont suivies d'un *).

Tableau 2 p. 10 55%

TABLEAU 2 RÉSULTATS DES QUESTIONNAIRES D'ÉVALUATION DES ESSAIS
DÉJÀ EXISTANTS ET DES ESSAIS EN COURS D'ÉLABORATION^a

7. 1. 1990 Lemna
Réponse à 55%

enzymatiques. La prolifération algale, surtout la vitesse de prolifération, a été le paramètre le plus souvent proposé pour les algues. Dans le cas des essais sur *Lemna*, on a proposé notamment la mesure de la croissance, en masse végétale humide ou sèche, la numération des feuilles ou des grains de chlorophylle.

La question du choix d'une espèce indicatrice appropriée pour le Canada a reçu des réponses très diverses. Cette diversité reflète les difficultés inhérentes au choix des espèces. Les experts en foresterie interrogés ont fourni les listes les plus détaillées, qui

comprenaient des espèces "cultivées" communes, comme le pin blanc, le pin gris, l'épinette noire, le pin Lodgepole, l'épinette de Sitka, le cèdre blanc, le cèdre de l'Ouest, le sapin de Douglas, le sapin et la pruche. Au nombre des espèces "indésirables" ou sans valeur commerciale, on comptait le tremble, le cerisier à grappes, le hart rouge, l'aulne, le bouleau, le saule, le framboisier, la ronce remarquable et la ronce occidentale. Les autres recommandations s'appliquant aux espèces terrestres étaient plus générales. On a proposé de prendre des espèces représentatives parmi les monocotylédones et les dicotylédones et diverses espèces cultivées. *Lemna* a été la plante aquatique vasculaire la plus fréquemment mentionnée. Toutes les personnes interrogées qui ont formulé des commentaires sur les espèces d'algues, sauf une, ont recommandé l'utilisation de plusieurs espèces au lieu d'une, et généralement, des espèces représentatives de chaque catégorie d'algues ont été suggérées. Certaines personnes n'ont pas aimé l'idée de restreindre les essais à quelques espèces indicatrices, préférant le choix d'espèces appropriées à chaque cas.

Selon la plupart des personnes interrogées qui s'estimaient en mesure de formuler une opinion à ce sujet, le système d'évaluation à plusieurs étapes constituait une bonne approche. Les réserves incluaient, entre autres, la détermination des limites de chaque étape dans le processus d'homologation et sur l'établissement de "déclencheurs" clairement identifiés ou de critères pour passer à l'étape suivante.

Une nette majorité des personnes interrogées estimait que les essais sur le terrain étaient reproductibles ou pouvaient l'être suffisamment pour servir au processus d'homologation. On a insisté sur l'importance de bien concevoir les études à ce sujet. Les experts travaillant dans le milieu universitaire étaient la plupart du temps contre une évaluation sur le terrain dans le cadre de la réglementation, car ils mettaient en doute la possibilité de reproduire et d'inclure des essais sur le terrain. Leur opinion est intéressante, car ces personnes sont les plus susceptibles d'avoir une expérience réelle des essais actuels sur le terrain.

Les avis étaient encore plus partagés au sujet de l'utilisation de mésocosmes dans le cadre de l'homologation. Les mésocosmes étaient généralement considérés comme de bons outils de sélection précédant les essais sur le terrain.

Il y a eu unanimité en faveur de l'utilisation d'un ensemble d'espèces pour ne pas avoir à se fier à une seule espèce. Certaines des personnes interrogées ont insisté sur le fait que ce type d'essai devait compléter, et non remplacer, la nécessité d'une évaluation sur le terrain. Le choix des espèces a été identifié comme le principal élément.

2.3 Examen de la documentation sur les essais existants et sur les essais en cours d'élaboration

2.3.1 Essais sur les algues. - Les questions qui ressortent de notre étude des essais de toxicité sur les algues sont essentiellement la sélection des espèces, la sélection des paramètres à évaluer et les contraintes des systèmes d'évaluation.

Nous avons étudié les données antérieures sur lesquelles était basé le choix de *Selenastrum capricornutum* qui est l'algue la plus couramment utilisée dans les essais, et nous avons considéré la possibilité de choisir d'autres espèces. Le choix de *Selenastrum* présente des avantages: rapidité de la prolifération, disponibilité, base de données importante et facilité de culture. Ce choix présente toutefois des inconvénients: une morphologie inappropriée à des mesures précises de volume, une production considérable de mucilage et une variabilité clonale. Si l'on ne veut pas utiliser *Selenastrum* uniquement, il est possible de prendre un représentant de chaque classe d'algues ou d'utiliser un véritable ensemble d'espèces représentant non seulement les différentes classes d'algues mais les espèces importantes pour l'environnement. Le choix d'un ensemble d'espèces est de plus en plus accepté; cependant, la base de données que requiert une telle évaluation est très petite, et le choix des espèces de cet ensemble ne peut être bien justifié.

Le choix de paramètres appropriés à évaluer dans les essais de toxicité portant sur les algues est également très controversé dans la littérature. La mesure de la prolifération algale, exprimée en nombre de cellules par millilitre, est le paramètre le plus couramment utilisé dans les essais existants. On a proposé de faire des mesures indirectes de la prolifération, notamment du taux de chlorophylle a , de l'ATP, de protéines, de l'ARN et de l'ADN. Ces mesures indirectes ne sont valides que si la prolifération est équilibrée, c'est-à-dire si le doublement de la biomasse se traduit par un doublement de l'un ou l'autre des constituants chimiques. Par conséquent, lorsque l'on utilise de tels indicateurs, il vaut mieux les étalonner par rapport à une mesure directe de la prolifération. L'avantage d'une utilisation des indicateurs de la biomasse réside dans la possibilité d'une automatisation de l'évaluation. Par exemple, les méthodes d'évaluation sur microplaques mesurent la formation et(ou) la dégradation de l'ATP dans de très petits volumes avec un grand nombre d'exemplaires qui peuvent se lire simultanément. Ainsi, la mesure de processus moins complexes sur le plan biochimique, comme les modifications de la fluorescence, l'absorption d'éléments nutritifs, le déplacement, le dégagement d'oxygène et les modifications du pH du milieu, pourrait remplacer l'évaluation de la croissance ou des indicateurs de croissance. Plusieurs de ces options sont excellentes pour étudier des problèmes précis, et il est très possible d'en automatiser certaines. Il est

prématuré d'exiger de tels essais dans des normes, mais ils peuvent toutefois servir à des essais de détermination d'intervalles et de sélection. Il faut également effectuer des comparaisons avec des essais normalisés mesurant la croissance.

Il faut tenir compte des paramètres physiques et chimiques et des contraintes des systèmes d'évaluation si l'on veut interpréter correctement les essais de toxicité effectués sur des algues. En raison du manque de connaissance sur les paramètres à évaluer, comme le pH, les conditions nutritives et la capacité des produits organiques à former des complexes, les données tirées d'un bon nombre d'ouvrages publiés sur la toxicité ne sont pas valides. Par conséquent, il est très important de préciser et de contrôler les paramètres physiques et chimiques du système d'évaluation susceptibles de modifier le comportement et la toxicité du produit chimique à évaluer. Les paramètres importants comprennent entre autres le pH, les matières organiques, la température, l'éclairement et la photopériode.

Les contraintes biologiques peuvent causer beaucoup de confusion dans les résultats des essais de toxicité. Les facteurs biologiques incluent notamment les caractéristiques morphologiques, la position taxinomique, la production de mucilage, la vitesse de croissance, l'aptitude à se développer dans une culture, la réaction à des équilibres ioniques principaux variés, les différences clonales, l'état physiologique de l'organisme et les caractéristiques de la division cellulaire. Par exemple, les sources documentaires indiquent qu'il peut y avoir des différences de toxicité variant de un à trois ordres de grandeur chez les groupes taxinomiques des algues, et que des cellules algales cultivées dans un milieu où il y a carence d'éléments nutritifs réagissent différemment des cellules cultivées dans un milieu où il y a suffisamment d'éléments nutritifs. Par conséquent, les procès-verbaux des essais effectués sur des algues doivent indiquer tous les paramètres biologiques susceptibles d'influer sur les résultats et l'interprétation de l'essai.

2.3.2 Essais sur les plantes vasculaires. - Les deux principaux sujets de préoccupation révélés par l'étude des essais sur les plantes vasculaires sont la sélection des espèces et les différentes méthodes utilisées.

On n'a pas encore bien élucidé la relation entre les espèces commerciales et les espèces dont l'importance fonctionnelle est très importante dans la nature. Il s'agit d'une question primordiale, car toutes les normes actuelles visant les essais sur des plantes terrestres utilisent presque exclusivement des espèces ayant une valeur commerciale. Il est peut-être raisonnable d'envisager une clause permettant de remplacer des espèces ayant une importance écologique par des espèces commerciales.

Des données sur les effets pourraient, à notre avis, contribuer à élargir la base de données sur la sensibilité relative des espèces vasculaires et sur les taux de récupération.

Les lignes directrices proposées pour le choix des espèces vasculaires à évaluer portent notamment sur des espèces représentatives de la région contaminée, des espèces représentatives de la diversité du règne végétal, la disponibilité de stocks de semences à un coût raisonnable, une croissance et un développement relativement rapide, des exigences limitées, non spécifiques, visant la croissance et le développement.

Les questions concernant les méthodes d'évaluation des plantes vasculaires incluent notamment la méthode de traitement, le type de milieu de support et les paramètres à évaluer pour indiquer les effets.

Il existe deux principales méthodes d'application des pesticides: leur pulvérisation sur les feuilles et leur incorporation dans le sol. La pulvérisation d'un pesticide sur les feuilles a des effets par absorption racinaire presque totalement négligeables, tandis que l'incorporation d'un pesticide dans le sol peut conduire à des résultats très variables. Il faudrait une série de normes détaillées comme celles figurant dans les règlements d'application du *Toxic Substances Control Act* des États-Unis.

Le type de milieu de support peut influencer sur la toxicité d'un pesticide lorsqu'il y a interaction produit-milieu. Il est raisonnable, semble-t-il, de recommander la gamme de caractéristiques du milieu de support qui pourraient reproduire le mieux les conditions prévues sur le terrain.

Les paramètres les plus couramment évalués sont la hauteur et la masse végétale fraîche ou sèche. On peut effectuer d'autres mesures comme celle de la superficie foliaire, la détermination de la coloration foliaire, la numération des feuilles et la mesure du dégagement de dioxyde de carbone. Ces mesures sont préférables à l'observation de plantes mortes ou au dénombrement des plantes. On a constaté que les résultats étaient plus précis lorsqu'on emploie plusieurs méthodes d'évaluation et que l'on calcule la moyenne des résultats.

Dans le cas des plantes vasculaires terrestres, on peut également utiliser des essais d'inhibition de la germination et de la croissance en boîtes de Pétri, des essais d'amélioration de l'allongement des racines, des essais de toxicité sur le pollen et des techniques de cultures cellulaires. Certains de ces essais pourraient servir à la détermination de la portée ou à la sélection, mais il faudrait acquérir plus d'expérience avec ces derniers avant de les intégrer dans des protocoles normalisés.

Les meilleures méthodes d'évaluation des macrophytes aquatiques ont été mises au point avec la lenticule mineure. On a constaté que les essais de renouvellement en conditions statiques effectués sur la lenticule étaient acceptables si les conditions de répétabilité étaient adéquates. Le paramètre le plus fréquemment utilisé est le nombre de feuilles. Comme dans le cas des autres essais, il est important de tenir compte de facteurs comme le pH et les constituants organiques dans le milieu de croissance, car ces facteurs peuvent influencer sur le comportement chimique et sur les effets des pesticides. La documentation ne mentionne pas aussi souvent les essais sur des macrophytes aquatiques à racines, et il n'existe pas de protocoles normalisés pour ce type d'essais. Il reste à résoudre certaines questions comme le choix d'une espèce indicatrice appropriée, la méthode de traitement et la durée des essais.

2.3.3 Méthodes d'évaluation en microcosme, en mésocosme et sur le terrain. - On dispose de méthodes d'évaluation en microcosme, en mésocosme et sur le terrain, même si elles sont plus perfectionnées dans le cas des systèmes aquatiques. Des protocoles d'essais en microcosme aquatique sont en cours de normalisation, et les résultats mis à jour sur la reproductibilité, la sensibilité et sur les possibilités de comparaison avec des résultats obtenus sur le terrain sont encourageants. Les méthodes d'essais en microcosme terrestre ne sont pas aussi fréquentes et nécessitent une normalisation. Dans les essais en mésocosme aquatique, il faut souvent utiliser divers enclos (appelés limnocorrals) dans un plan d'eau naturel ou artificiel ou utiliser des étangs artificiels ou des modèles de cours d'eau. Ces essais permettent de relier les essais en laboratoire aux essais sur le terrain, mais ils sont plus complexes, plus coûteux et plus long que les études en microcosme. Les études en mésocosme terrestre sont extrêmement rares. Les études sur le terrain sont également rares, mais elles seraient indispensables selon la plupart des experts. Il est important de développer encore plus ces trois catégories d'essais, car il sera ainsi possible de mieux comparer les résultats des essais en laboratoire portant sur une seule espèce à la fois aux effets observés dans l'environnement.

2.4 Lacunes à combler en matière d'évaluation de la phytotoxicité

Il nous reste à acquérir des connaissances importantes sur la toxicité des pesticides pour les plantes non visées, notamment sur: les effets des mélanges de pesticides, notamment les mélanges extemporanés, les effets des produits de dégradation et les agents tensio-actifs, les adjuvants ou d'autres produits ajoutés à la préparation commerciale d'un pesticide, les méthodes d'évaluation en microcosme terrestre, en

mésocosme et sur le terrain, les méthodes normalisées d'évaluation en mésocosme aquatique et sur le terrain, les méthodes d'extrapolation à partir de résultats d'essais normalisés, et les dosages de résidus servant à estimer les effets sur le terrain.

Il est très complexe d'évaluer les effets des mélanges. Toutefois, une étude récente de ce domaine nous donne des renseignements sur des méthodes et des approches d'évaluation (Vouk *et al.*, 1987).

Les données sur les effets des mélanges extemporanés, des agents tensio-actifs, des adjuvants et d'autres additifs peuvent être complétées par les données sur l'efficacité recueillies au cours du processus d'homologation.

La mise au point des méthodes et les essais en microcosme terrestre, en mésocosme et sur le terrain sont pauvrement documentés. Le manque de données est manifeste, surtout dans le cas des systèmes forestiers.

Parallèlement à l'évaluation de la toxicité, il faut perfectionner le secteur de l'évaluation des dangers de façon à optimiser la rétroaction et la concordance entre ces deux champs d'étude.

EXIGENCES ACTUELLES RELATIVES À L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES PESTICIDES POUR LA VÉGÉTATION NON VISÉE

3.1 Agriculture Canada

Au Canada, l'homologation des pesticides est régie par la *Loi sur les produits antiparasitaires*. Agriculture Canada a émis des lignes directrices sur l'homologation des pesticides (1984) en vertu de cette loi (y compris les circulaires à la profession T-1-237 à T-1-241). Ces lignes directrices exigent des essais de détermination de la toxicité des pesticides pour l'environnement, notamment des essais sur leur toxicité pour les oiseaux, les mammifères, les organismes aquatiques et les invertébrés non visés. Cependant, il n'existe aucune disposition spécifique au sujet des essais sur la végétation terrestre non visée. Les essais d'inhibition de la croissance des algues peuvent entrer dans la catégorie des essais sur les "organismes aquatiques". Cette catégorie comprend les essais de toxicité aiguë, les essais à court terme ainsi que les "études spéciales" incluant les essais à long terme, les essais sur la reproduction, les essais sur le terrain et les essais sur le métabolisme.

Il n'existe aucune directive spécifique à l'égard des protocoles d'évaluation à adopter. La plupart des essais doivent être faits avec des ingrédients actifs de qualité technique. Cependant, on tient compte de l'utilisation du produit formulé dans le rapport sur l'ingrédient actif de qualité technique et dans un rapport distinct sur le produit formulé. Il faut se référer aux normes annuelles de l'ASTM, aux lignes directrices de l'OCDE (OCDE, 1981, 1984) et aux lignes directrices de l'EPA des É.-U. élaborées aux termes du *Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act* (FIFRA, 1986) et du *Toxic Substances Control Act* (TSCA, 1987a).

Le présent rapport a été rédigé en partie pour répondre au manque de lignes directrices canadiennes spécifiques sur l'évaluation de la toxicité des pesticides pour l'environnement. La première série de lignes directrices, qui traitent de la chimie et du devenir des pesticides dans l'environnement, a été publiée récemment (Agriculture Canada, 1987).

3.2 Environmental Protection Agency des États Unis (EPA)

L'EPA a publié des lignes directrices sur l'évaluation des pesticides en vertu du *Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act* (FIFRA, 1984, 1986), et la Subdivision J des lignes directrices s'applique à l'évaluation de la toxicité des pesticides pour les plantes non visées (Holst et Ellwanger, 1982).

3.2.1 Plantes non visées d'une "zone visée" (FIFRA, 1986; Holst et Ellwanger, 1982). - L'EPA a constaté qu'il existait une confusion entre les essais de phytotoxicité proposés dans ses lignes directrices et ceux effectués normalement dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité d'un produit. À son avis, il faudrait séparer ces deux types d'évaluations. Cependant, l'EPA a affirmé par la suite que l'évaluation de l'efficacité et l'évaluation de la phytotoxicité dans une zone visée "sont habituellement effectuées simultanément et doivent continuer de l'être" (Holst et Ellwanger, 1982). Cet organisme a ensuite renoncé à exiger des évaluations de phytotoxicité dans les zones visées, car "les détenteurs de certificats d'homologation sont généralement disposés à accepter la responsabilité globale d'un produit quant à son efficacité et à sa phytotoxicité" (Holst et Ellwanger, 1982). Il a également renoncé à rendre obligatoires les études sur l'antagonisme ou la synergie des mélanges extemporanés envers les plantes visées des zones visées sous réserve de pouvoir parfois demander de telles informations.

L'EPA des É.-U. a émis des lignes directrices pour l'évaluation des zones visées afin d'obtenir des données qui pourraient s'avérer nécessaires dans certains cas. Ces lignes directrices sont résumées ci-dessous.

3.2.1.1 Évaluation au besoin

- Évaluation non exigée, sauf dans certains cas définis par l'EPA.
- Évaluation non exigée pour les herbicides qui éliminent la végétation à long terme ou définitivement.

3.2.1.2 Norme d'évaluation

- *Substance à évaluer*: employer le produit formulé.
- *Espèces*: utiliser des espèces végétales visées d'une zone visée ou abritant des organismes nuisibles, selon les instructions données par le fabricant sur l'étiquette.
- *Doses d'emploi*: doses minimale, maximale et le double de la dose maximale, selon les instructions données par le fabricant sur l'étiquette; il faut également déterminer la valeur de la dose sans effet.
- *Adjuvants*: il faut indiquer les effets observés lorsqu'un adjuvant est ajouté au pesticide à évaluer, y compris les doses maximales d'addition.
- *Mélange extemporané*: procéder à des études sur l'antagonisme et la synergie du mélange sur des parcelles adjacentes.
- *Traitements en série*: comme dans le cas des mélanges extemporanés.

- **Sites:** tous les endroits où l'on prévoit utiliser le produit.
- **Protocole:** le même que pour l'emploi homologué prévu du pesticide.

3.2.1.3 **Procès-verbal**

- **Généralités:** moment des traitements, conditions météorologiques, dilutions des produits à pulvériser, témoins non traités.
- **Types d'emploi:**
 - cultures de plein champ: vigueur, récupération, rendement, degré de phytotoxicité sur les plantes d'intérêt des zones visées;
 - pâturages et terrains de parcours: diminution du peuplement et de la vigueur, récupération, modifications du rendement;
 - essences fruitières et à noix: modifications du feuillage, de la croissance, du rendement;
 - pelouses et gazon: couleur, densité, pourcentage de couverture, vitesse de croissance, effets sur l'enracinement et le tallage;
 - plantes d'ornement: sensibilité des cultivars représentatifs;
 - aménagement forestier: effets sur les essences d'intérêt; il faut porter une attention particulière aux espèces non compétitives de couverture au niveau du sol qui facilitent les pratiques d'aménagement des terres.
- **Méthode de traitement:** description spécifique du type d'appareillage utilisé, de son réglage et de son fonctionnement.
- **Pratiques culturales:** répercussions des pratiques culturales sur les effets néfastes possibles du produit (p. ex. l'irrigation, le fauchage, etc.).
- **Réactions des plantes vivant dans les zones visées:** peuplement (dénombrement), vigueur (hauteur, poids, longueur, diamètre), profondeur de plantation (effets de différentes profondeurs), verse, phytotoxicité (décoloration, malformations, dessiccation, défoliation, mort), développement (retard d'émergence, prolongation de la croissance, retard ou diminution de la floraison ou de la nouaison, retard de maturation), rendements.
- **Plantation ultérieure:** effets sur les plantes d'intérêt plantées dans la région dans les six mois qui ont suivi le traitement.

3.2.2 Plantes non visées d'une "zone non visée" (FIFRA, 1986; Holst et Ellwanger, 1982). - L'EPA des É.-U. utilise pour cette catégorie un système d'évaluation en trois étapes. La première, soit la plus fondamentale, est une étape de sélection; elle est suivie d'une deuxième étape si des effets néfastes ont été observés dans une proportion de 25 p. 100 ou plus (CE 25) sur une ou plusieurs espèces végétales terrestres ou de 50 p. 100

(CE 50) sur plus d'une espèce végétale aquatique avec la dose maximale mentionnée par le fabricant sur l'étiquette. On décide cas par cas (espèces terrestres) du passage à l'étape 3 (essais sur le terrain). On passe également à la troisième étape si l'on estime que l'exposition au produit se traduira par un effet supérieur à la CE 50 pour toutes les espèces végétales aquatiques évaluées à la deuxième étape ou si l'on prévoit que le pesticide se retrouvera dans les cours d'eau après le traitement d'une zone visée, après le rejet d'une eau polluée par le pesticide ou après son utilisation en milieu forestier (Holst et Ellwanger, 1982).

On trouvera ci-dessous un sommaire des lignes directrices d'évaluation pour les zones non visées. Les normes générales des essais sont exposées dans l'ouvrage de Holst et Ellwanger (1982).

3.2.2.1 Espèces terrestres. - Première étape, essais d'inhibition de la germination des semences et(ou) d'inhibition de l'émergence des semis et de la vigueur végétative:

- **Évaluation au besoin:** en procédant cas par cas; à l'exception des produits chimiques injectés dans les essences, incorporés dans le sol, utilisés dans les systèmes de recapture, les traitements avec applicateur à mèche et dans les piscines.
- **Substance à évaluer:** qualité technique de l'ingrédient actif; s'il n'existe pas de qualité technique, se servir du produit industriel ou du produit formulé possédant le plus fort pourcentage d'ingrédient actif.
- **Espèces:** six espèces appartenant à au moins quatre familles de dicotylédones, dont le soja (*Glycine max*) et une plante-racine; quatre espèces appartenant à au moins deux familles de monocotylédones, dont le maïs (*Zea mays*).
- **Doses d'emploi:** une concentration égale à la dose maximale mentionnée par le fabricant sur l'étiquette ou égale à trois fois la dose maximale possible dans la zone non visée.
- **Nombre de plantes:** prévoir au moins trois répétitions, chacune nécessitant cinq plantes par dose dans le cas des essais d'inhibition de la vigueur; prévoir au moins trois répétitions nécessitant chacune au moins dix graines par dose dans le cas des essais d'inhibition de la germination.
- **Sites:** chambre climatique ou serre, ou petites parcelles de terrain (pour les essais de vigueur).

- **Durée:** essai d'inhibition de la germination - cinq jours; essai d'inhibition de l'émergence - observations hebdomadaires pendant au moins deux semaines après la germination.
- **Protocoles:**
 - essai d'inhibition de la germination: placer les graines entre des feuilles de papier-filtre stérile ou de papier pour germination humidifié avec le produit chimique; ou dans du sable lavé à l'acide; ou dans un sol "normal"; les graines peuvent être stérilisées en surface; la température doit être optimale pour les espèces et la variété utilisées; pulvériser ou incorporer le produit chimique; consigner le nombre de graines germées par rapport au nombre plantées;
 - essai d'inhibition de l'émergence des semis: dans des pots contenant du sable lavé à l'acide ou dans un sol normal; les graines peuvent être stérilisées en surface; conditions optimales pour l'espèce et la variété utilisées; traiter le sol par pulvérisation du produit ou par un autre moyen, effectuer les observations après dix et 14 jours; consigner le nombre de semis où l'on observe une émergence; on peut prolonger les observations de 14 jours pour évaluer les effets des pesticides sur la vigueur des plantes;
 - essai d'inhibition de la vigueur végétative: pulvériser le produit selon toutes les méthodes acceptables; choisir la plante une à quatre semaines après son émergence; consigner les effets selon le degré de phytotoxicité (pourcentage ou cote), les modifications anormales de la croissance et du développement et(ou) les anomalies morphologiques de la plante.
- **Expression des résultats et procès-verbal d'essai:** indiquer le nombre de semences évaluées et le nombre de semences ayant germé ou émergé au cours du traitement (dans cette étape, on n'utilise qu'une seule dose) et ceux des plantes témoins; décrire l'aspect et le développement des semences et des plantes émergentes; calculer le pourcentage d'inhibition pour chaque espèce par rapport aux plantes témoins; inscrire la masse, la hauteur ou les paramètres de croissance (facultatif).
- **Passage à l'étape suivante:**
 - si plus de 25 p. 100 des plantes ou semis chez une ou plusieurs espèces présentent des effets de phytotoxicité, il faut passer à la deuxième étape (à la dose maximale mentionnée sur l'étiquette ou à trois fois la dose maximale prévue dans l'environnement);
 - si moins de 25 p. 100 des plantes présentent des effets de phytotoxicité, l'EPA des É.-U. peut exiger un essai supplémentaire pour déterminer la concentration à laquelle le produit n'a pas d'effet discernable.

3.2.2.2 Plantes terrestres. - Deuxième étape, essais d'inhibition de la germination des semences et(ou) d'inhibition de l'émergence des semis et de la vigueur végétative:

- *Évaluation au besoin:* si 25 p. 100 des plantes chez une ou plusieurs espèces végétales présentent des effets de phytotoxicité à la première étape; certaines parties de la deuxième étape peuvent être combinées à la première étape.
- *Doses d'emploi:* au moins cinq doses, incluant une concentration inférieure à la concentration efficace ($< CE\ 50$) et une concentration non toxique; les doses les plus fortes doivent être inférieures à la dose maximale employée à la première étape; les doses doivent suivre des progressions géométriques définies par un facteur maximal de deux (p. ex. 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 kg/ha).
- *Espèces:* au moins les espèces présentant des effets phytotoxiques à la première étape.
- *Expression des résultats et procès-verbal d'essai:* outre les détails opératoires à indiquer pour la première étape, exprimer les concentrations efficaces pour 25 p. 100 ou 50 p. 100 des plantes ($CE\ 25$ ou $CE\ 50$) et, dans la mesure du possible, les limites de confiance à 95 p. 100; déterminer la concentration à laquelle le produit n'a pas d'effet discernable (concentration à laquelle on n'observe aucun effet significatif sur le rendement prévu, la qualité ou l'esthétique de la culture ou de la plante).
- *Passage à l'étape suivante:* si la dose maximale recommandée ou l'exposition prévue dans l'environnement est supérieure à la $CE\ 25$ pour une ou plusieurs espèces végétales, passer à la troisième étape.

3.2.2.3 *Plantes terrestres.* - Troisième étape, essais d'inhibition sur le terrain:

- *Évaluation au besoin:* lorsque la dose d'emploi maximale recommandée ou l'exposition prévue dans l'environnement est supérieure ou égale à la $CE\ 25$ pour une ou plusieurs espèces végétales.
- *Substance à évaluer:* produit formulé.
- *Doses d'emploi:* les mêmes que celles utilisées à la deuxième étape.
- *Espèces:*
 - dicotylédones: des représentants de trois familles;
 - monocotylédones: des représentants de trois familles;
 - cryptogames vasculaires: des représentants de deux familles;

- bryophytes ou hépatiques: un représentant;
 - gymnospermes: un représentant;
 - les espèces végétales employées lors des première et deuxième étapes de l'évaluation peuvent être utilisées pour satisfaire aux exigences relatives aux monocotylédones et aux dicotylédones;
 - s'il est peu probable que l'un des groupes végétaux mentionnés ci-dessus soit exposé à des pesticides, l'évaluation n'est pas exigée;
 - il est possible qu'il faille évaluer des espèces supplémentaires s'il est difficile de déterminer la sélectivité générale des pesticides.
- *Conditions du milieu d'essai:* conditions sur le terrain semblables à celles de l'habitat naturel.
 - *Durée:* suffisamment longue pour permettre d'évaluer les applications multiples mentionnées par le fabricant sur l'étiquette; les observations doivent se poursuivre au moins deux semaines après le dernier traitement et jusqu'à un maximum de quatre semaines pour que l'on puisse observer la récupération ou la mort.
 - *Saison du traitement:* la saison indiquée sur l'étiquette.
 - *Emplacements des essais:* dans les endroits où l'on emploie le pesticide, d'après l'étiquette; des essais spécifiques peuvent être exigés dans une région.
 - *Expression des résultats et procès-verbal d'essai:* le procès-verbal doit faire référence à toutes les indications précédentes; effectuer les opérations demandées à la deuxième étape.

3.2.2.4 Plantes aquatiques. - Première étape, essais d'inhibition de la croissance et de la reproduction des plantes aquatiques:

- *Évaluation au besoin:* même procédure qu'en 3.2.2.1.
- *Substance à évaluer:* qualité technique de l'ingrédient actif (voir 3.2.2.1).
- *Espèces:*
 - *Selenastrum capricornutum* (chlorophycée d'eau douce); si le pesticide est destiné à la lutte contre les plantes aquatiques nuisibles autres que celles que l'on retrouve dans les piscines, employer d'autres espèces comme *Lemna gibba* (lenticule); *Skeletonema costatum* (diatomée marine); une diatomée d'eau douce; *Anabaena flos-aquae* (cyanophycée).
- *Doses d'emploi:* dose maximale indiquée sur l'étiquette ou égale à trois fois la dose maximale prévue dans l'environnement.

- **Nombre de plantes:** prévoir au moins trois répétitions, chacune nécessitant cinq plantes vasculaires (*Lemna* - trois feuilles par plante) par dose; dans le cas des algues*; utiliser *S. capricornutum*, 10^3 cellules/ml; diatomée d'eau douce, 50×10^3 cellules/ml; *A. flos-aquae*, 50×10^3 cellules/ml; et *S. costatum*, 2×10^3 cellules/ml.
- **Site:** chambre climatique.
- **Durée:** dans le cas de *Lemna*, au moins 14 jours avec des observations tous les trois jours; dans le cas des algues, au moins cinq jours avec des observations quotidiennes.
- **Protocoles:**
 - *Lemna*: Conditions du milieu. - Éclairement de 5000 lux ($100 \text{ E/m}^2/\text{s}$) avec un tube fluorescent à lumière blanche, chaude; photopériode: éclairage continu; température constante de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Milieux de culture. - Liquides; éléments nutritifs: milieu de Hoagland type M, sans EDTA ni saccharose; pH de $5,0 \pm 0,1$ après stérilisation du milieu à l'autoclave. Mode opératoire. - Disposer de récipients dont la taille soit suffisamment grande pour qu'il y ait un rapport milieu/quantité de 5:2; l'essai peut se faire dans des conditions non axéniques si l'on utilise des milieux non organiques; on peut ajouter du saccharose (10 g/l) et de l'EDTA (9 mg/l) si l'on veut obtenir une floraison.
 - *Selenastrum capricornutum*: Conditions du milieu. - Éclairement de 4000 lux ($80 \text{ E/m}^2/\text{s}$) avec un tube fluorescent à lumière blanche, froide; photopériode: éclairage continu; température constante de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Milieux de culture. - Liquides; milieu de l'EPA des É.-U. (1978); ne pas utiliser d'EDTA dans le milieu d'essai; pH de 7,5.
 - diatomée d'eau douce: Conditions du milieu. - Éclairement de 4300 lux ($80 \text{ E/m}^2/\text{s}$) avec tube fluorescent à lumière blanche, froide; photopériode: éclairage continu; température constante de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Milieux de culture. - Liquides; éléments nutritifs: EPA des É.-U. (1971); pH de 7,5.
 - *Anabaena flos-aquae*: Conditions du milieu. - Éclairement de 2000 lux ($40 \text{ E/m}^2/\text{s}$) avec tube fluorescent à lumière blanche, froide; photopériode: éclairage continu; température constante de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Milieux de culture. - Liquides; éléments nutritifs: milieu de l'EPA des É.-U. (1978); ne pas utiliser d'EDTA dans les milieux d'essai; pH de 7,5.
 - *Skeletonema costatum* (Walsh et Alexander, 1980): Conditions du milieu. - Éclairement de 4000 lux ($80 \text{ E/m}^2/\text{s}$) avec un tube fluorescent à lumière blanche, froide; photopériode de 14 h d'éclairement et de 10 h d'obscurité; température constante de $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Milieux de

*La numération cellulaire des algues a été fournie par l'EPA (1971, 1978) et par Walsh et Alexander (1980).

culture. - Ajout d'une préparation commerciale de sel de mer artificiel avec ajout de métaux à l'état de traces, de vitamines et autres sels divers; pH de 8,1.

• *Expression des résultats et procès-verbal d'essai:*

- *Lemna*: exprimer les changements de croissance en nombre de plantes et de feuilles initiales et en nombre de plantes et de feuilles supplémentaires produites;
- algues: exprimer la croissance en cellules/millilitre, en biomasse/volume ou en degré de croissance déterminé par spectrophotométrie;
- présenter dans un tableau le pourcentage d'effets observés dans le temps sur les organismes testés par rapport aux effets observés sur les organismes témoins.

• *Passage à l'étape suivante:*

- si plus de 50 p. 100 des plantes chez toutes les espèces végétales aquatiques présentent des effets de phytotoxicité à la dose maximale mentionnée par le fabricant sur l'étiquette par rapport aux espèces témoins, passer à la deuxième étape;
- si moins de 50 p. 100 des plantes présentent des effets de phytotoxicité, l'EPA des É.-U. peut exiger des essais supplémentaires pour déterminer de façon plus précise la concentration à laquelle le produit n'a pas d'effet discernable.

3.2.2.5 Plantes aquatiques. - Deuxième étape, essais d'inhibition de la croissance et de la reproduction des plantes aquatiques:

- *Évaluation au besoin:* si les essais de la première étape mettent en évidence des effets de phytotoxicité dans une proportion supérieure à 50 p. 100.
- *Doses d'emploi:* au moins cinq doses, incluant une concentration inférieure à la concentration efficace ($< CE_{50}$) et une concentration non toxique; les doses les plus fortes doivent être inférieures à la dose maximale indiquée par le fabricant sur l'étiquette, et déjà utilisée à la première étape; les doses doivent suivre une progression géométrique d'un facteur maximal de deux.
- *Espèces:* au moins les espèces qui ont présenté des effets phototoxiques à la première étape; suivre le protocole d'essai qui s'applique (décrit pour chaque espèce à la première étape, voir 3.2.2.4).
- *Expression des résultats et procès-verbal d'essai:* exprimer la valeur de CE_{50} d'après les résultats des mesures de la biomasse; les limites de

confiance de 95 p. 100 dans la mesure du possible; et la concentration à laquelle le produit n'a pas d'effet observable.

- *Passage à l'étape suivante:* si la dose d'emploi maximale recommandée ou l'exposition prévue dans l'environnement sont supérieures à la CE 50, quelle que soit l'espèce; s'il y a application directe du pesticide dans l'eau, s'il y a rejet d'eau contenant le pesticide ou si l'on emploie le pesticide en milieu forestier, passer alors à la troisième étape. **REMARQUE.** - Il n'est pas nécessaire d'évaluer les pesticides destinés uniquement à des plantes terrestres.

3.2.2.6 Plantes aquatiques. - Troisième étape, essais d'inhibition de la croissance et de la reproduction des plantes aquatiques sur le terrain:

- *Évaluation au besoin:* consulter le Passage à l'étape suivante de la deuxième étape.
- *Substance à évaluer:* produit formulé.
- *Doses d'emploi:* les mêmes que celles indiquées à la deuxième étape.
- *Espèces:*
 - dicotylédones: un représentant;
 - monocotylédones: des représentants de trois familles;
 - cryptogames vasculaires: des représentants de trois familles;
 - algues: un représentant de chaque classe;
 - bryophytes ou hépatiques: un représentant;
 - on peut utiliser les espèces végétales des étapes 1 et 2 pour les monocotylédones ou les dicotylédones;
 - on peut exiger l'évaluation d'autres espèces s'il est difficile de déterminer la sélectivité générale du pesticide.
- *Conditions du milieu:* sol natif, eau ou autres substrats semblables à la zone indigène; il peut être nécessaire de diminuer la lumière; températures du sol, de l'air et de l'eau voisines de celles de l'habitat naturel; essais effectués dans des zones confinées d'un plan d'eau en conditions contrôlées ou dans de vastes hydrocultures; les essais ne doivent pas être effectués dans de l'eau courante.
- *Protocole:* suivre un protocole ayant reçu au préalable l'approbation de l'EPA (Environmental Protection Agency des États-Unis).

- *Durée*: suffisamment longue pour permettre d'évaluer les applications multiples mentionnées sur l'étiquette; les observations doivent se poursuivre pendant au moins deux semaines après le dernier traitement, et au maximum jusqu'à quatre semaines pour observer la récupération ou la mort.
- *Saison*: la saison indiquée sur l'étiquette.
- *Emplacements des essais*: dans les endroits où l'on emploie le pesticide; des essais plus spécifiques peuvent être exigés dans une région.
- *Expression des résultats et procès-verbal d'essai*: le procès-verbal doit faire référence à toutes les indications précédentes; effectuer les opérations demandées à la deuxième étape (voir 3.2.2.5).

3.2.3 Exemples de plantes non visées pour lesquelles l'EPA des É.-U. a exigé une évaluation. - L'EPA exige en général des essais sur des plantes non visées si le pesticide doit être utilisé dans une zone où les espèces sont menacées d'extinction (Holst, communication personnelle). L'importance de l'habitat faunique n'entre en ligne de compte que si celui-ci abrite des espèces menacées d'extinction. L'EPA des É.-U. étudie surtout des herbicides employés à des fins non alimentaires, notamment les herbicides utilisés pour éliminer les broussailles et les autres plantes indésirables poussant le long des emprises.

Tous les pesticides décrits dans la présente section ont été examinés durant le processus de "ré-homologation", connu sous le nom de Registration Standards Program (Programme des normes d'homologation). Ce programme examine les données sur tous les produits antiparasitaires contenant le même ingrédient actif. Le programme a pour but de réévaluer les dangers possibles découlant des emplois présentement homologués du pesticide, de déterminer le besoin de données supplémentaires relatives aux effets sur la santé et sur l'environnement et de déterminer si le pesticide satisfait aux "critères sans effet néfaste excessif du FIFRA" (EPA des É.-U., 1985).

On a soumis un pesticide, le paraquat, à un programme dit de présomption réfutable en regard de l'homologation, selon lequel il incombe à l'industrie de "démontrer la raison" pour laquelle on ne doit pas imposer des restrictions plus sévères à l'emploi d'un pesticide déjà homologué (Castrilli et Vigod, 1987). Un tel processus est mis en oeuvre si l'EPA établit, après expérimentation ou en pratique, qu'il est nécessaire d'évaluer un pesticide de façon plus poussée pour déterminer s'il peut entraîner certains "risques excessifs". Les "déclencheurs" ou critères de risque sont la toxicité

aiguë, la toxicité chronique, d'autres effets chroniques (effets sur la reproduction, neurotoxicité, malformations congénitales, etc.), des diminutions importantes chez des organismes non visés ou des espèces menacées d'extinction, ou l'inexistence de traitements d'urgence ou d'antidotes (Castrilli et Vigod, 1987).

Les pesticides pour lesquels on a exigé des essais sur des plantes non visées incluent:

3.2.3.1 *Hexazinone* (EPA des É.-U., 1982)

- *Emplois homologués*: herbicide homologué pour lutter contre de nombreuses mauvaises herbes annuelles, vivaces et bisannuelles, et les plantes ligneuses poussant dans des régions non agricoles, les plantations de sapins de Noël et les zones de reboisement; son emploi est également homologué pour la canne à sucre et la luzerne.
- *Essais exigés*: essais d'inhibition de la germination des semences, de la vigueur végétative, essais sur les macrophytes aquatiques, essais sur les algues (première étape).
- *Raisons invoquées*: l'hexazinone est toxique pour les plantes à racines peu profondes et peut constituer un danger pour les espèces menacées d'extinction dans les zones de reboisement.

3.2.3.2 *Pichlorame* (EPA des É.-U., 1985)

- *Emplois homologués*: herbicide homologué pour lutter contre les plantes ligneuses et herbacées poussant dans les régions non agricoles, y compris les pâturages et les terrains de parcours, autour des bâtiments d'exploitation agricole, dans des emprises, les forêts, le chaparral et les terres impropres à la culture.
- *Essais exigés*: première étape, essais d'inhibition de la germination des semences et(ou) de l'émergence des semis, de la vigueur végétative, de la croissance des plantes aquatiques; étapes 2 et 3, essais selon les résultats obtenus à la première étape.
- *Raisons invoquées*: le pichlorame est très phytotoxique et facilement absorbé par les racines et le feuillage. Il est très persistant dans les sols non soumis à la lixiviation, et l'on peut détecter dans certains cas une phytotoxicité bien au-delà d'une année après le traitement. D'après l'EPA des É.-U., le pichlorame a des effets néfastes sur la végétation non visée.

L'EPA n'a pas été en mesure de déterminer de façon certaine si ces dommages provenaient d'une erreur de traitement, d'une mauvaise utilisation, d'une dérive du produit, du lessivage, du ruissellement ou de la persistance. En outre, on a estimé qu'un certain nombre de plantes menacées d'extinction risquaient d'être touchées lorsque l'on employait du pichlorame dans leur habitat.

3.2.3.3. *Glyphosate* (EPA des É.-U., 1986)

- *Emplois homologués*: herbicide homologué pour exterminer les herbes, les carex et les mauvaises herbes latifoliées (annuelles et vivaces) dans les cultures comestibles et non comestibles, dans les régions aquatiques à vocation agricole ou non agricole, dans les serres (vocation non agricole), à l'extérieur des habitations et dans les forêts.
- *Essais exigés*: première étape, essais d'inhibition de la germination des semences et(ou) de l'émergence des semis, de la vigueur végétative, de la croissance des plantes aquatiques; étapes 2 et 3, essais selon les résultats obtenus à la première étape.
- *Raisons invoquées*: l'utilisation du glyphosate peut constituer un danger pour les plantes menacées d'extinction, notamment sur les terrains de parcours et dans les pâturages, mais également sur les terres agricoles et dans les endroits destinés à la sylviculture.

3.2.3.4. *Prométhryne* (EPA des É.-U., 1987b)

- *Emplois homologués*: herbicide homologué pour exterminer les plantes adventices latifoliées et herbeuses dans les cultures de coton, de céleri, d'ambrevades, de maïs, de plantes d'ornement et d'essences forestières (lit de semences des pépinières).
- *Essais exigés*: première étape, essais d'inhibition de la germination des semences et(ou) de l'émergence des semis, de la vigueur végétative, de la croissance des plantes aquatiques; étapes 2 et 3, essais selon les résultats de la première étape.
- *Raisons invoquées*: employée en traitement de prélevée dans les cultures de maïs, la prométhryne peut constituer un danger pour plusieurs espèces menacées d'extinction.

3.2.3.5 **Paraquat** (EPA des É.-U., 1987a)

- *Emplois homologués:* herbicide employé pour exterminer les "mauvaises herbes et autres plantes" sur les terres à vocation agricole et non agricole, les terres à essences forestières d'ornement et le gazon.
- *Essais exigés:* l'utilisation de ce pesticide pose un problème. D'après un document de l'EPA (1987b), les essais sur la végétation non visée ne sont requis, "conformément à l'article 158.50" du 40 CFR, que dans les cas des pesticides utilisés en milieu forestier et sur les pâturages naturels, et dans le premier cas, il faut procéder à des essais sur des plantes aquatiques. Toujours d'après le document de l'EPA (1978b), le paraquat étant un herbicide non sélectif, les plantes dans les pâturages ou sur tout autre habitat susceptible d'être traité au paraquat pourront être exposées à cet herbicide. L'EPA semble se fier ici à l'étiquetage: "comme option raisonnable et prudente, si l'on n'utilise pas de paraquat... sur l'habitat ou à proximité de l'habitat d'un bon nombre de plantes identifiées par l'OES (Office of Endangered Species). Ainsi, il faut exiger un étiquetage visant à protéger les espèces menacées d'extinction dans le cas de tous les produits formulés destinés au traitement des cultures, des terrains de parcours et des pâturages". Il faut remarquer qu'un étiquetage semblable a été exigé pour tous les autres pesticides examinés précédemment, mais qu'en plus, des essais sur la végétation non visée étaient également requis.

3.3 **OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques)**

Les lignes directrices de l'OCDE s'appliquent aux "produits chimiques" en général et pas seulement aux pesticides. Par conséquent, leurs lignes directrices sont adaptées à des emplois plus généraux.

En l'absence d'une méthodologie appropriée pour des essais multi-espèces dans le milieu naturel, il serait pratique d'utiliser une approche qui pourrait comporter trois étapes: le "niveau de base", le "niveau de confirmation" et le "niveau définitif" (OCDE, 1981).

Le niveau de base consisterait à effectuer des essais simples indiquant les effets possibles d'un produit sur quelques types d'organismes ayant une importance fonctionnelle. L'OCDE propose trois essais pour le niveau de base dont un seul s'applique aux plantes non visées, soit l'essai d'inhibition de la croissance algale. Cet essai d'une

durée de trois jours est également le seul essai sur la végétation non visée figurant dans "l'ensemble minimal de données préalables à la commercialisation" exigées par l'OCDE pour l'évaluation des produits chimiques (Sergy, 1987).

Les essais effectués au niveau de confirmation doivent fournir des données plus complètes si des doutes quant à l'acceptabilité d'un produit chimique ont été soulevés au niveau de base (OCDE, 1981). À cet effet, ces essais ont une plus grande complexité et peuvent être reliés à des milieux spécifiques ou à d'autres composants de l'environnement. Le niveau de confirmation comporte également l'étude de l'exposition chronique et des voies spécifiques de contamination.

Il faut avoir recours au niveau définitif d'essais dans "certains cas particuliers, par exemple quand le produit chimique est présent dans l'environnement en concentrations élevées et/ou quand certaines indications permettent de prévoir un danger possible pour l'environnement" (OCDE, 1981). Il peut être nécessaire de choisir des essais qui reproduisent le plus possible les conditions naturelles. Actuellement, il est difficile de trouver des essais adéquats qui s'appliquent à plusieurs espèces à la fois.

D'après l'OCDE, il est souhaitable au niveau de base d'avoir une indication de la plage et de la variabilité des effets prévus. Ainsi, les essais multi-espèces sont plus utiles qu'un essai très précis ne portant que sur une espèce.

L'OCDE recommande que les essais du niveau de confirmation soient plus précis. À ce niveau, on possède déjà des indications sur la nature des essais prévus, et il est important de vérifier ces indications de façon non équivoque (OCDE, 1980).

Au niveau définitif, les essais multi-espèces n'atteindront jamais une précision élevée, car la variabilité des résultats dépend de plusieurs facteurs. Le mieux est de trouver un "certain compromis entre une normalisation réalisable sur le plan expérimental et une représentation approximative des conditions naturelles" (OCDE, 1980).

Les critères permettant de passer du niveau de base au niveau de confirmation sont les suivants:

a) Si la substance est classée comme "non facilement" dégradable, d'après les critères du Groupe sur la biodégradation et bio-accumulation de l'OCDE.

b) S'il y a bio-accumulation significative de la substance, d'après les critères du Groupe sur la biodégradation et bio-accumulation de l'OCDE.

c) Si la concentration létale de la substance pour un organisme soumis à des essais est inférieure à 1 mg/l (CL 50, toxicité aiguë) ou si la substance a une toxicité élevée d'après les critères des Groupes de toxicité à court et à long termes.

d) Si les valeurs de la CL 50 obtenues ne présentent pas d'asymptotes.

e) S'il y a indication de mutagénèse (génotoxicité), d'après les critères des Groupes de toxicité à court et à long termes.

f) S'il y a modifications du volume de production, du type d'emploi ou d'élimination pouvant provoquer un accroissement d'un ordre de grandeur de la concentration prévue de la substance dans l'environnement (CPE).

g) Si la qualité biologique (p. ex. la toxicité) du composé s'accroît par suite d'une modification chimique, physique ou biologique de l'environnement.

h) Si la concentration sans effet observé (CSEO) pour *Daphnia*, les poissons ou les algues reste inférieure à dix fois la CPE (concentration prévue dans l'environnement).

On trouve au tableau 3 un résumé des types d'essais de confirmation proposés par l'OCDE dans la mesure où certains des critères de transition sont respectés. Dans le cas des plantes, l'OCDE propose des essais d'inhibition de la croissance sur d'autres espèces d'algues, des essais de toxicité aiguë (CL 50), des essais d'inhibition de la croissance et de la reproduction sur les lenticules (*Lemna*) et sur d'autres espèces aquatiques vasculaires, sans compter des essais d'inhibition de la germination, des essais d'inhibition de la croissance (sur des mono- et des dicotylédones), ainsi qu'une évaluation de cycles biologiques partiels sur des plantes terrestres.

Il n'existe aucune règle fixe quant aux essais définitifs établis par l'OCDE. En général, les produits qui présentent un intérêt mais dont l'utilisation peut menacer l'environnement sont des candidats aux essais définitifs (OCDE, 1980). Un volume de production élevé, une faible dégradabilité, une toxicité élevée et la détection de propriétés néfastes non prévues peuvent indiquer la nécessité de telles études. L'OCDE ne recommande pas d'essais définitifs particuliers, car ce genre d'essais n'a pas encore été complètement mis au point. Cet organisme propose d'effectuer des essais dans les catégories générales suivantes:

- a) essais sur des communautés naturelles en milieu clos;
- b) essais en aquarium sur des communautés artificielles;
- c) essais en compartiments avec des niveaux trophiques distincts.

3.3.1 **Algues, essais d'inhibition de la croissance.** - Niveau de base (OCDE, 1984).

- **Évaluation au besoin:** on exige une évaluation de la toxicité de la substance au "niveau de base" préalablement à des essais plus poussés.
- **Substance à évaluer:** la question de l'évaluation de l'ingrédient actif en fonction du produit formulé n'est pas traitée.
- **Espèces:** chlorophycée à croissance rapide. On estime que les espèces suivantes conviennent à ce type d'essai:
 - *Selenastrum capricornutum*, ATCC 22662;

TABEAU 3 MESURES PROPOSÉES POUR LES ESSAIS DE CONFIRMATION À LA SUITE DE L'ÉVALUATION DES RÉSULTATS OBTENUS AU NIVEAU DE BASE, D'APRÈS LES CRITÈRES DE TRANSITION (OCDE, 1980)

Mesure	Critère	Observation
Utiliser des espèces supplémentaires dans les essais de toxicité aiguë	c, f, g, h	Choisir des espèces d'après les essais supplémentaires recommandés en tenant compte du type probable d'exposition
Élargir les conditions de essais de toxicité aiguë	c, f, g, h	Répéter les essais de toxicité aiguë précédents dans différentes conditions de température, pH, dureté, etc.
Augmenter la durée des essais	a, b, d	Exposition à long terme à des doses sublétales pour : • améliorer l'estimation de la CSEO • confirmer les résultats obtenus au niveau de base
Essais sur le développement	c, f	Évaluation de la sensibilité d'autres étapes du cycle biologique. Amélioration de l'estimation de la CSEO
Détermination de réactions autres que la mortalité	c, f	Évaluation des effets sur des paramètres ayant une importance écologique comme la croissance, la reproduction, le comportement, relativement à la production, le type d'emploi et d'élimination de la substance
Essais plus poussés sur la bio-accumulation	a, b, e	Essais destinés à établir le niveau d'équilibre et la cinétique de l'accumulation et de l'élimination
Essais physicochimiques plus poussés	a, f, g	Cinétique du transport et du devenir de la substance pour permettre d'améliorer les calculs de la CPE
Essais plus poussés sur la mutagenèse (génotoxicité)		Essais d'exposition à long terme à de faibles concentrations et essais avec des organismes ayant une importance écologique (p. ex. le poisson), vérifications du pouvoir cancérigène et tératogène

Remarque. - Les lettres qui figurent dans la colonne "Critère" réfèrent à celles de la liste de la section 3.3.

- *Scenedesmus subspicatus*, 86.81 SAG;
 - *Chlorella vulgaris*, CCPA 211/11b;
 - dans le cas où l'on utilise d'autres espèces, il faut signaler la souche.
- *Doses d'emploi*: choisir la gamme de concentrations d'après les résultats des essais de détermination des gammes de concentrations; utiliser alors au moins cinq concentrations dans une progression géométrique. Les concentrations les plus faibles ne doivent entraîner aucun effet; la concentration la plus forte doit entraîner une inhibition de la croissance d'au moins 50 p. 100.
 - *Nombre de plantes* (concentration cellulaire): 10^4 cellules/ml; prévoir trois répétitions par dose et, idéalement, six plantes témoins.
 - *Site*: chambre de culture.
 - *Durée*: 72 heures, en faisant des observations après 24, 48 et 72 heures.
 - *Protocole*:
 - conditions du milieu: éclairement de $120 \text{ E/m}^2/\text{s} \pm 20$ p. 100, 400-700 nm, avec un tube fluorescent à lumière blanche, universelle; photopériode: éclairement continu; température constante de $21 \pm 2^\circ \text{C}$.
 - milieux de culture: liquides; éléments nutritifs: voir OCDE (1984), notamment l'EDTA; pH de $8,0 \pm 1,0$.
 - mode opératoire: on peut employer des substances de référence; on propose d'utiliser du dichromate de potassium; consulter l'OCDE (1984) pour le traitement des substances ayant différentes solubilités.
 - *Expression des résultats et procès-verbal d'essai*: mesurer la concentration cellulaire dans les cultures d'essai et dans les cultures témoins, établir un diagramme avec les concentrations des pesticides et le moment des mesures; on obtient des courbes de croissance en traçant en fonction du temps la valeur moyenne de la concentration cellulaire pour chaque concentration de pesticide et pour les témoins. Déterminer la relation concentration-effet, soit en comparant les aires sous les courbes de croissance (biomasse), soit en comparant la vitesse de croissance; les résultats basés sur la biomasse sont exprimés en $\text{CE}_b 50$ et les résultats basés sur la vitesse de croissance sont exprimés en $\text{CE}_v 50$. Il faut indiquer également le moment des mesures (p. ex. $\text{CE}_v 50$ (24-48 h)).
- REMARQUE.** - Le volume cellulaire est une mesure aussi pertinente que le nombre de cellules (OCDE, 1984).

3.3.2 Plantes terrestres, essais d'inhibition de la croissance. - Niveau de confirmation (OCDE, 1984).

- *Évaluation au besoin*: consulter les critères de transition.
- *Substance à évaluer*: non précisée.
- *Espèces*: trois espèces au minimum dont au moins une de chacune des trois catégories qui suivent:
 - catégorie 1: ray-grass anglais *Lolium perenne*; riz *Oryza sativa*; avoine *Avena sativa*; sorgho *Sorghum bicolor*;
 - catégorie 2: moutarde *Brassica alba*; colza *Brassica napus*; radis *Raphanus sativus*; navet *Brassica rapa*; choux chinois *Brassica campestris*; var. *chinesis*;
 - catégorie 3: vesce commune *Vicia sativa*; ambérique *Phaseolus aureus*; trèfle commun *Trifolium pratense*; foin grec *Trifolium ornithopodioides*; laitue *Lactuca sativa*; cresson *Lepidium sativum*.
- *Doses d'emploi*: témoin, 1, 10, 100 mg de substance par kg de sol séché à l'étuve; incorporer dans le sol en dissolvant le produit chimique dans un solvant volatil, mélanger la solution avec du sable, laisser s'évaporer le solvant, mélanger le sable avec du sol tout en maintenant un rapport constant sable/sol pour tous les traitements.
- *Nombre de plantes*: quatre échantillons par traitement distribués au hasard dans un carré; au moins cinq graines par échantillon, toutes les graines devant appartenir à la même catégorie de taille.
- *Sites*: serre ou chambre climatique.
- *Durée*: il faut attendre au moins 14 jours après l'émergence de 50 p. 100 des semis témoins.
- *Protocole*:
 - conditions du milieu: température, humidité et éclairement "appropriés au maintien d'une croissance normale";
 - milieux de culture: pots non poreux en plastique ou vernis, de taille suffisante pour ne pas gêner la croissance; arroser au besoin; terre pas nécessairement stérile passée au tamis (maille de 0,5 cm), dont la teneur en carbone ne doit pas dépasser 1,5 p. 100 (3 p. 100 de matière organique), dont la teneur en particules fines ($< 20 \mu m$) doit se situer entre 10 et 20 p. 100, et le pH, entre 5,0 et 7,5; ne pas utiliser d'agents tensio-actifs; tout traitement du sol qui entraîne une dispersion uniforme du produit chimique est acceptable;
 - mode opératoire: indiquer dans le procès-verbal si une substance de

référence a été utilisée; au moins 80 p. 100 des graines témoins doivent produire des semis sains pour que l'essai soit considéré comme valide.

- *Expression des résultats et procès-verbal d'essai:* le procès-verbal doit indiquer le nombre de plantes qui ont émergé par échantillon et la masse moyenne des plantes par échantillon. Exprimer l'effet de la substance sur l'émergence des plantes en CL 50 et l'effet sur la croissance en CE 50.
- *Domaine d'application:* cet essai ne permet pas d'évaluer les dommages causés par la vapeur ou par contact direct du produit avec le feuillage.

3.4 Ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation du Royaume-Uni

Le Royaume-Uni ne possède pas de lignes directrices spécifiques sur l'évaluation des organismes non visés. On n'exige que quatre types d'essais pour les organismes non visés: détermination de la toxicité aiguë d'une substance pour les oiseaux (administration orale), CL 50 (toxicité aiguë) pour des espèces appropriées de poissons, CL 50 (toxicité aiguë) pour des espèces appropriées servant de nourriture aux poissons et DL 50 (toxicité aiguë, administration orale) et détermination de la toxicité par contact pour des abeilles domestiques. Des essais d'efficacité sont utilisés dans le cas de la toxicité "dans une zone visée" pour la végétation non visée; les plantes non visées sont implicitement des espèces cultivées seulement. Au Royaume-Uni, on effectue des essais d'efficacité dans le cadre d'un "plan volontaire approuvé sur les produits chimiques agricoles" (U.K. MAFF, 1984). Là encore, il n'existe aucune ligne directrice détaillée.

Le ministère de l'Agriculture, des Pêches et de l'Alimentation applique un plan d'évaluation des dangers que présentent les produits chimiques pour des plantes non visées. La méthode utilisée par le ministère pour traiter les données recueillies selon une séquence logique est illustrée à la figure 1 (Tooby, 1978).

Le plan comporte cinq étapes, chacune à l'origine de données plus complexes. On demande aux fabricants de soumettre leurs données sous les rubriques générales mentionnées dans les colonnes de la figure 1. "La plupart des substances demandent une évaluation préliminaire des dangers. La progression ne doit pas toujours nécessairement être effectuée séquentiellement, et les données découlant des premières étapes peuvent mettre en évidence des problèmes pour lesquels la meilleure réponse vient des données obtenues aux dernières étapes" (Tooby, 1978).

L'un des points essentiels du fonctionnement de ce plan est l'établissement de "marges de sécurité". Tooby cite des données selon lesquelles, pour la plupart des produits chimiques, la concentration maximale sans effet sur une espèce quelconque n'est pas

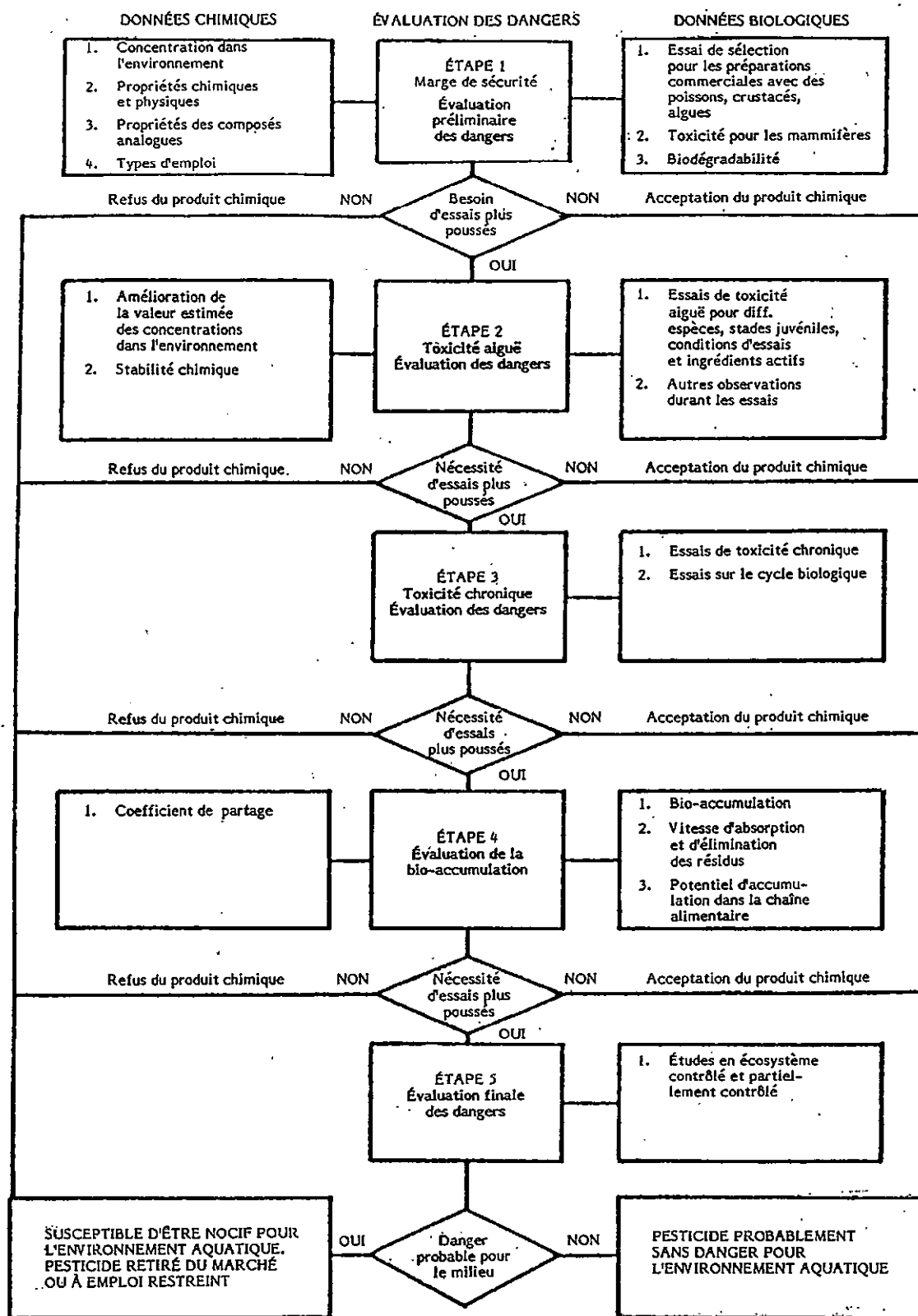


FIGURE 1 PLAN D'ÉVALUATION DES DANGERS POUR L'ENVIRONNEMENT (Tooby, 1978)

inférieure à un centième de la CL 50 - 96 h pour cet organisme. Par conséquent, il propose une évaluation préliminaire des dangers en divisant la CL 50 - 96 h par la concentration maximale mesurée dans l'eau après une utilisation normale; la valeur obtenue est appelée marge de sécurité. Si elle est inférieure à 100, il faudra probablement évaluer plus à fond le produit chimique. Cette marge de sécurité est appliquée à l'espèce la plus sensible chez les poissons, les invertébrés et les algues.

Le type d'emploi prévu du produit chimique influe également sur la décision de pratiquer des essais plus poussés. Par exemple, les produits chimiques utilisés directement dans l'eau comme les herbicides aquatiques demanderaient presque à coup sûr une évaluation au-delà du niveau préliminaire.

3.5 Ministère de l'Industrie primaire de l'Australie

Le ministère de l'Industrie primaire (DPI) de l'Australie ne possède pas de lignes directrices détaillées pour l'évaluation de la toxicité. Il fournit des dispositions générales visant la protection des cultures traitées et l'évaluation des dangers pour des cultures et des plantes non visées.

Les dispositions concernant les essais de phytotoxicité sur des cultures traitées "ou toute autre plante désirable" comportent des essais avec des produits formulés, seuls et mélangés à d'autres produits formulés qui sont fréquemment employés. Tout effet négatif sur le rendement ou la qualité des cultures doit être consigné. Il faut établir des marges de sélectivité pour les cultures traitées. Les facteurs à considérer incluent les doses d'emploi, l'humidité du sol, le type de sol, la température, la prédisposition variétale, les méthodes de traitement, l'emploi d'adjuvants, la taille des cultures, l'âge et l'état physiologique et les méthodes de gestion. Il faut tenir compte des effets à long terme des pesticides persistants (Australian DPI, 1985).

Les dispositions du ministère de l'Industrie primaire visant les cultures et les plantes non visées sont très générales. "Dans le cas où l'on prévoit qu'un produit formulé pourrait être dangereux pour des espèces non visées . . . , il faut présenter les données expérimentales indiquant sa toxicité pour les espèces" (Australian DPI, 1985). On accorde de l'importance aux effets de traitements répétés et de l'entraînement de résidus du sol, aux produits chimiques persistants, volatils, sujets à une bio-accumulation, aux produits chimiques appliqués dans les cours d'eau ou à proximité et pulvérisés par voie aérienne ou par d'autres moyens qui pourraient les faire dévier de la zone visée.

Les dispositions concernant "le milieu naturel" dans son ensemble sont encore plus générales. "On exige des renseignements complets sur les propriétés, le devenir et les

effets probables des produits chimiques sur des modèles caractéristiques de constituants du milieu naturel" (Australian DPI, 1985).

3.6 Organisation internationale de normalisation (ISO)

L'ISO a récemment publié une version préliminaire mise à jour de son essai d'inhibition de la croissance algale (ISO, 1987). Il s'agit d'un essai général portant sur les "substances chimiques" très hydrosolubles et qui ne sont pas dégradées ni éliminées rapidement du système évalué.

- *Évaluation au besoin*: non précisée.
- *Substance à évaluer*: non précisée.
- *Espèces*: *Scenedesmus subspicatus* Chodat ou *Scenedesmus capricornutum* Printz.
- *Doses d'emploi*: au moins cinq concentrations suivant une progression géométrique; les concentrations les plus fortes doivent inhiber complètement la croissance ou provoquer au moins une inhibition distincte; la concentration la plus faible ne doit pas causer d'effets différents de ceux observés sur les plantes témoins.
- *Site*: chambre climatique.
- *Durée*: 72 heures, avec des observations à 24, 48 et 72 heures.
- *Protocole*:
 - conditions du milieu: éclairement de 120 E/m²/s avec un tube fluorescent à lumière blanche, froide; photopériode: éclairement continu; température constante de 23 ± 2 °C;
 - milieux de culture: liquides; éléments nutritifs: voir ISO (1987), incluent l'EDTA; pH de 8,3 ± 0,2;
 - mode opératoire: il est recommandé d'effectuer auparavant un essai de détermination des plages de concentrations; procéder à un essai en double en prenant des témoins pour chaque plage de concentrations; les répétitions ne sont pas nécessaires pour les essais préliminaires, mais trois répétitions sont nécessaires pour les essais définitifs; agiter les cultures chaque jour ou utiliser un agitateur à secousses ou des cultures aérées; déterminer le nombre de cellules deux fois avec un compte-cellule électronique ou trois fois avec une cellule à numération pour chaque période d'observation; on peut également utiliser un fluorimètre, un turbidimètre, un colorimètre ou un spectrophotomètre pour compter les cellules si l'on a vérifié l'exactitude de la relation avec les numérations effectuées par compte-cellule électronique ou par cellule à numération; les substances peu hydrosolubles peuvent être dissoutes

dans du D.M.S.O. (diméthylsulfoxyde) ou de l'acétone; la teneur en D.M.S.O. ou en acétone doit être inférieure à 0,1 ml/litre; préparer des témoins (blancs) avec 10 μ l de D.M.S.O. ou d'acétone et des contrôles avec le milieu dans lequel vivent les algues uniquement (ces instructions figuraient dans la version précédente (Sergy, 1987)); le pH du milieu témoin ne doit pas varier de plus de 1,5.

- *Expression des résultats et procès-verbal d'essai:* à partir des résultats, établir la concentration de cellules obtenues au ml, établir un diagramme gaussologarithmique avec le nombre de cellules par rapport à la concentration de la substance toxique, déduire la CE 50 de l'aire sous la courbe de croissance ou de vitesse de croissance du diagramme (comme dans les lignes directrices de l'OCDE); présenter les résultats relatifs à la biomasse en CE_b 50 et les résultats relatifs à la vitesse de croissance en CE_v 50; indiquer clairement l'intervalle de temps utilisé, par exemple CE_v 50 (0-72 h); déterminer la CSEO moyenne (concentration sans effet observé); consigner les anomalies des cellules algales; ne pas tenir compte de la stimulation de la croissance à de faibles concentrations de la substance d'essai lorsque l'on calcule la CE 50.

3.7 Japon: loi concernant la réglementation des produits chimiques agricoles

Au Japon, il est interdit de vendre des pesticides sans avoir obtenu une homologation accordée par le ministère de l'Agriculture, des Forêts et des Pêches. La demande d'homologation doit être accompagnée d'un document faisant état des résultats expérimentaux concernant l'efficacité, la phytotoxicité, la toxicité pour les mammifères (aiguë et chronique), la toxicité pour les poissons, la persistance (dans les cultures et dans le sol), ainsi que d'un échantillon du pesticide avec les méthodes de dosage (Fukuda, 1987). Les différentes étapes de l'homologation d'un pesticide sont illustrées à la figure 2.

Les lignes directrices sur les pesticides ont été publiées en 1982 par la Société de l'industrie chimique agricole du Japon sous la supervision de la Station d'inspection des produits chimiques agricoles. Malheureusement, ces lignes directrices n'ont pas encore été traduites.

D'après le bref exposé général des dispositions japonaises au sujet de l'homologation, les données sur l'efficacité et la phytotoxicité sont, semble-t-il, recueillies au même moment durant les essais effectués dans les stations expérimentales officielles (Fukuda, 1987). Ceci donne à entendre que les essais sur la phytotoxicité pour des plantes non visées ne sont peut-être pas exigés, mais on ne peut en être certain.

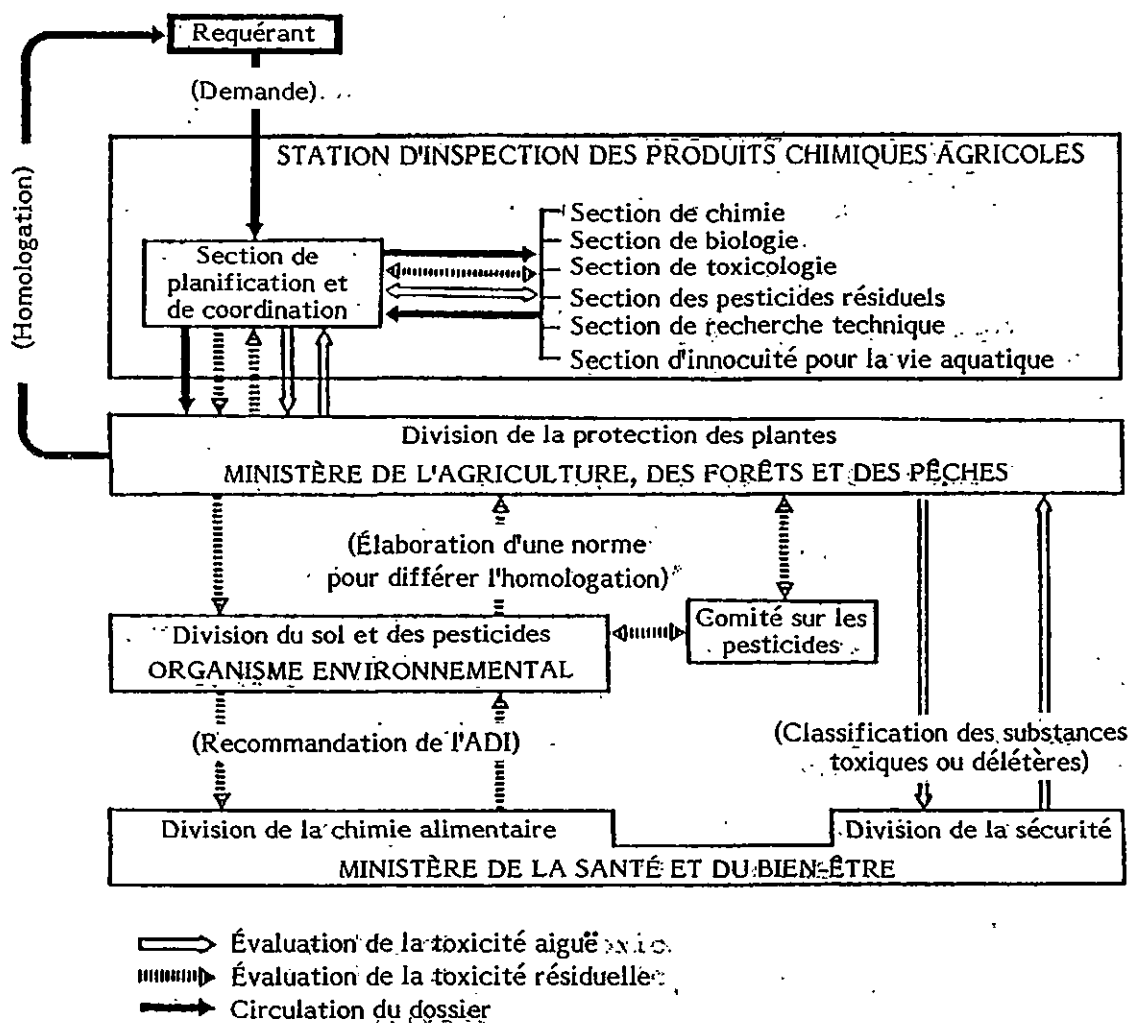


FIGURE 2 MARCHE À SUIVRE POUR L'HOMOLOGATION DES PESTICIDES AU JAPON

3.8 Communauté économique européenne (CEE)

La CEE a publié une Directive concernant la réglementation des substances dangereuses (CEE, 1979). Cette directive s'applique à toute substance toxique en général. On affirme que les clauses ne s'appliquent pas aux pesticides "dans la mesure où ils sont soumis à des procédures d'approbation qui sont au moins équivalentes, ou bien à des procédures de notification de la Communauté, ou encore à des procédures non encore uniformisées". Les études de phytotoxicité prescrites par la Directive consistent en un essai d'inhibition de la croissance algale et en un "essai sur une plante supérieure". Par conséquent, les pays membres disposeraient vraisemblablement de clauses sur l'homologation des pesticides qui nécessiteraient au moins ces deux essais.

L'essai d'inhibition de la croissance algale de la CEE est fondamentalement le même que l'essai d'inhibition de la croissance algale de l'OCDE. Il nous a été impossible de trouver une différence entre le protocole de l'OCDE (1984) et l'essai d'inhibition de la croissance algale de la CEE (CEE, 1987). L'essai sur une plante supérieure est également basé sur la méthode de l'OCDE; cependant, on en évalue actuellement une variante améliorée.

3.9 Résumé des exigences

Le tableau 1 (chapitre 2) indique les dispositions relatives aux essais selon les divers organismes. Jusqu'à présent, l'EPA des É.-U. a fourni les directives les plus détaillées sur l'évaluation de la végétation non visée. L'OCDE a fourni certaines directives détaillées, mais seulement pour deux essais spécifiques.

Une exigence fondamentale pour tous les essais de toxicité recommandés par divers organismes est l'application des "Bonnes pratiques de laboratoire", récemment étudiées par Sergý (1987).

4.1 EPA des É.-U.

Dans ses lignes directrices de 1982 à la Subdivision J, l'EPA résume les critiques formulées par certains chercheurs (Holst et Ellwanger, 1982). Quatre principaux domaines posent des problèmes: le choix des espèces, le choix de la dose, le passage d'une étape d'essais à l'autre et l'expression des résultats. Ces domaines ont également fait l'objet de discussions avec Robert Holst de l'EPA à Washington, co-auteur des lignes directrices sur les plantes non visées (Subdivision J). H

4.1.1 Choix des espèces. - La liste des espèces initialement recommandées par l'EPA a été jugée trop rigide ou trop longue. Par réaction, l'EPA a laissé plus de latitude pour le choix des espèces terrestres et a limité le nombre d'espèces aquatiques exigées pour la première étape à *Selenastrum capricornutum*. Cependant, l'EPA a tenu à préciser que si le pesticide devait être utilisé à l'extérieur, en milieu aquatique, les essais devraient porter sur quatre autres espèces aquatiques. D'après l'EPA, ce choix repose sur des espèces ayant déjà été évaluées de façon complète par des fabricants de produits chimiques sur l'importance économique, sur l'existence de données valables concernant les paramètres de croissance et sur la disponibilité de souches spécifiques (Holst et Ellwanger, 1982).

Le choix des espèces est considéré comme le problème le plus épineux par le personnel de l'EPA chargé d'élaborer des lignes directrices sur l'évaluation de la toxicité (Holst, communication personnelle). La principale espèce aquatique exigée est *Selenastrum capricornutum*, car il s'agit d'une espèce que l'on rencontre partout et pour laquelle on possède une vaste base de données. En outre, cette espèce est apparentée à *Chlorella*, et les mesures peuvent s'effectuer par compte-cellule électronique (Holst, communication personnelle). L'EPA permet également des essais sur *Chlorella*, mais cette espèce est très variable. Selon Holst, l'approvisionnement en espèces commence à poser des difficultés. Il a été difficile d'obtenir *Skeletonema* (diatomée marine) et *Navicula* (diatomée d'eau douce), qui sont nécessaires pour les essais de toxicité avant l'application directe d'un pesticide dans un plan d'eau. En outre, on ne trouve plus de *Lemna gibba* G-3, l'espèce de lenticule prescrite à la Subdivision J; le laboratoire qui cultivait cette souche n'existe plus. L'EPA des É.-U. accepte maintenant tous les types de *Lemna gibba*. Elle accepte également *Lemna minor*, cependant cette espèce pose des problèmes taxinomiques et n'est pas très sensible.

Le choix des espèces terrestres pose encore plus de difficultés. La liste initiale de dix espèces (six dicotylédones et quatre monocotylédones) est considérée comme trop restrictive. Ces espèces ne sont pas toujours représentatives de régions géographiques spécifiques. Par conséquent, l'EPA s'oriente vers une large catégorisation des espèces qui sont normalement utilisées dans les recherches sur la toxicité et la croissance. Elle se contente de "proposer" des espèces au lieu de fournir une liste obligatoire. En outre, l'EPA ne cherche plus à faire des recommandations s'appuyant strictement sur leur sensibilité. Elle suggère plutôt d'effectuer des recoupements aussi larges que possible pour représenter les espèces vivant réellement dans l'environnement qui pourraient être touchées par le pesticide. Cependant, cet organisme insiste pour que des plantes non résistantes fassent partie de l'évaluation.

Il existe plusieurs problèmes particuliers liés au choix des espèces, notamment la sélection de cultivars au sein des espèces (un cultivar de tomate peut être plus résistant qu'un autre) ou l'obtention de plantes recommandées, car il n'est pas toujours possible de s'approvisionner en semences de façon régulière et garantie. À la question "pourquoi choisir autant d'espèces cultivées et aucune espèce sauvage?", la réponse de l'EPA est la suivante: il est beaucoup plus facile de justifier le choix d'une espèce ayant une valeur économique qu'une espèce sauvage; nous avons de meilleures connaissances sur les espèces cultivées qui sont de surcroît plus faciles à obtenir. En résumé, la position de l'EPA sur le choix des plantes terrestres consiste à trouver des espèces non menacées d'extinction qu'il est possible d'évaluer et qui sont représentatives de l'environnement.

Des discussions avec d'autres représentants de l'EPA des É.-U. nous ont permis de dégager les points qui suivent au sujet du choix des espèces:

a) Un très petit nombre d'espèces à évaluer diminue la sensibilité avec laquelle l'EPA peut évaluer les effets toxiques.

b) Préablement au choix des espèces, on devrait effectuer des essais rigoureux sur un grand nombre d'espèces exposées à au moins dix pesticides déjà homologués; le choix pourrait se faire d'après les résultats de ces essais.

c) Les espèces doivent être jugées uniquement sur leur aptitude à servir de "bio-indicateur".

d) Il n'y a eu aucune tentative systématique visant à définir avec précision des espèces sensibles; par exemple les espèces d'algues qui peuvent être le plus sensibles à des contaminants organiques comme les pesticides peuvent être strictement autotrophes. De telles espèces ne peuvent dégrader des sources complexes de carbone pour utiliser le carbone.

4.1.2 Choix de la dose. - Le choix de la dose adéquate est un point essentiel du système par étapes de l'EPA. L'emploi de doses inappropriées à la première étape peut

avoir des conséquences négatives sur toutes les décisions et sur tous les essais ultérieurs. Les personnes ayant formulé des commentaires, résumés par l'EPA, insistent sur l'emploi de la dose maximale mentionnée par le fabricant sur l'étiquette pour les essais de la première étape. Selon un bon nombre de personnes, cette dose est excessive et on devrait se baser sur l'exposition de l'environnement. L'EPA a recommandé ultérieurement de prendre une concentration égale à trois fois l'exposition de l'environnement ou la dose maximale mentionnée sur l'étiquette pour la première étape. On n'a pas donné d'explications sur la façon de déterminer l'exposition de l'environnement, mais elle pourrait vraisemblablement découler de données sur le devenir du pesticide dans l'environnement.

4.1.3 Passage d'une étape d'essais à l'autre. - Les critères pour passer d'une étape à l'autre ont fait l'objet de nombreuses remarques et critiques. D'après l'EPA, les personnes chargées d'examiner ces critères ont généralement estimé qu'ils étaient trop faibles; par exemple, on a proposé d'utiliser la CE 90 ou la CE 95 au lieu de la CE 50 pour les plantes aquatiques (Holst et Ellwanger, 1982).

Lorsqu'on leur a demandé de justifier le choix de la CE 25 pour les plantes terrestres dans le cas des essais de la deuxième étape, les représentants de l'EPA ont répondu que les pesticides présentaient à la CE 25 des effets susceptibles d'influer sur la régénération, même dans les régions non cultivées. Il existe également dans la Subdivision J une clause stipulant que si la variation, ou l'erreur, au sein d'une espèce est suffisamment significative pour masquer les effets néfastes de 25 p. 100, il faut alors répéter les essais (Holst et Ellwanger, 1982).

En choisissant la CE 50 pour évaluer les plantes aquatiques à la troisième étape, on a essayé de garantir la protection de l'environnement tout en tenant compte des commentaires selon lesquels la CE 90 ou la CE 95 conviendraient mieux (Holst et Ellwanger, 1982). L'EPA a donné les raisons suivantes pour justifier le choix de la CE 50:

- Les chercheurs ne s'accordent généralement pas bien sur la valeur susceptible de décrire le mieux possible le "pire cas" ou sur une concentration permettant une récupération facile des populations.
- On utilise la CE 50 comme "déclencheur" pour exiger des études et on estime qu'elle serait plus représentative de la réalité. On a également obtenu fréquemment des valeurs de la CE 50 pour un bon nombre de plantes aquatiques, tandis que les valeurs de la CE 90 ou de la CE 95 ne reposent pas sur de bonnes bases statistiques.

- L'EPA a diminué le nombre d'espèces évaluées aux première et deuxième étapes en fondant leur choix sur le type d'utilisation.
- La dose maximale a été diminuée à la concentration maximale mentionnée par le fabricant sur l'étiquette ou à trois fois la concentration maximale prévue dans l'environnement (Holst et Ellwanger, 1982).

En récapitulant la position de l'EPA sur le choix de la CE 50, les représentants de cet organisme ont soutenu que la CE 50 était plus facile à mesurer et permettait plus de souplesse. En outre, l'EPA est encline à utiliser la CE 90 dans certains cas, car la régénération "n'est pas un problème aussi grave chez les espèces aquatiques" (Holst, communication personnelle). Il semble que le plus souvent la décision de passer à l'étape suivante soit laissée au jugement.

En ce qui a trait au passage d'une étape à l'autre, on peut se demander notamment la raison pour laquelle les pesticides utilisés sur des plantes terrestres seulement ne font pas l'objet d'essais de toxicité sur des plantes aquatiques. L'EPA estime que la quantité de ces pesticides qui atteint réellement les plans d'eau est faible, surtout si l'on applique les critères de la CE 50 et de la CE 90. En outre, l'industrie ne tient pas à ce que l'on augmente les exigences au sujet des données qu'elle doit fournir.

Le passage à la troisième étape se décide cas par cas quand on veut appuyer l'homologation d'un produit formulé. Les lignes directrices générales qui s'appliquent alors sont les suivantes: si l'exposition environnementale prévue est supérieure à la CE 50, quelle que soit l'espèce; si le pesticide est appliqué directement dans l'eau; s'il y a déversement d'eau traitée; ou si le pesticide est utilisé en milieu forestier (Holst et Ellwanger, 1982). L'EPA insiste sur le fait qu'il faut faire preuve de beaucoup de discernement lorsque l'on évalue le besoin d'études sur le terrain (Fite *et al.*, 1987). En pratique, du moins dans un environnement terrestre, il est peu probable que l'EPA exige des essais sur le terrain, à moins que le produit ne semble menacer de façon importante la faune non visée (c'est-à-dire les vertébrés terrestres, et plus particulièrement les oiseaux et les mammifères) (Fite *et al.*, 1987).

L'EPA ne fournit pas d'instructions particulières concernant les méthodes d'évaluation à la troisième étape. La principale question à laquelle il faut répondre est: "Quelle est la probabilité que le produit utilisé ait des effets sur l'environnement?" (Holst, communication personnelle). En outre, comme Fite *et al.* (1987) l'ont exprimé, l'objectif des études sur le terrain est de réfuter l'hypothèse selon laquelle la faune non visée serait menacée. On s'attend à ce que les personnes qui demandent l'homologation d'un produit

soumettent un protocole qui examine de façon satisfaisante toutes les questions, en supposant l'utilisation des Bonnes pratiques de laboratoire (Holst, communication personnelle). Les essais doivent être suffisamment minutieux pour donner une bonne indication de la réalité, et suffisamment souples pour tenir compte de variables comme le mode d'action chimique, le type d'emploi, le type de culture, la méthode de traitement ainsi que la densité et la diversité des espèces (Fite *et al.*, 1987). Les essais doivent être également pratiques et économiques à effectuer.

Dans le cas des études sur des plantes terrestres, l'EPA recommande une approche à deux étapes, une étape de sélection et une étape définitive (Fite *et al.*, 1987). Si les études de sélection indiquent des répercussions plus que mineures ou si d'autres données disponibles donnent à penser que des effets néfastes se sont produits ou sont extrêmement probables, il faut demander des études définitives plus poussées au point de vue quantitatif. Les essais de sélection recommandés par Fite *et al.* (1987) qui s'appliquent aux plantes peuvent comporter un dosage des résidus de pesticides dans les sources de nourriture pour la faune dans les régions traitées ou à proximité de ces régions. Des études définitives pourraient comporter une estimation de la mortalité et des effets sur la reproduction et sur la croissance. Les études de sélection pourraient être limitées à la possibilité d'effets aigus; on n'aborderait pas les effets chroniques.

Le choix de régions géographiques pour les études sur le terrain doit conserver l'équilibre entre la nécessité de garder un nombre pratique de régions et la nécessité de rendre compte de l'usage du pesticide dans des régions vastes et diversifiées. C'est pourquoi, l'EPA recommande d'orienter le choix des régions géographiques à évaluer vers celles qui sont susceptibles de présenter le risque le plus élevé (Fite *et al.*, 1987).

L'EPA rédige actuellement des lignes directrices sur les études en mésocosme; ces lignes directrices ne sont pas aussi spécifiques que celles exposées dans le *Toxic Substances Control Act* (TSCA, 1987a; Holst, communication personnelle). Cependant, elles constituent une alternative aux essais sur le terrain en grandeur réelle.

4.1.4 Taille de la population. - L'EPA montre beaucoup de flexibilité pour le choix de la taille de la population; cependant, elle "encourage l'utilisation de populations aussi vastes que possible... afin de viser un niveau de confiance de 90 à 95 p. 100 avec un niveau de signification inférieur à 0,1". Si l'on tient compte de l'incertitude inhérente au procédé de progression d'une étape à l'autre, il serait souhaitable d'avoir une population aussi large que possible (répétitions et nombre de plantes par répétition).

4.1.5 Observations générales. - Des discussions avec des membres de l'EPA ont révélé qu'en ce qui concerne la marche à suivre la plus prometteuse afin d'élaborer des protocoles d'essais appropriés pour des bio-essais, on pourrait s'entendre sur les points suivants:

- a) l'identification des espèces sensibles parmi une vaste gamme d'organismes;
- b) le choix d'une série d'espèces sensibles à évaluer dans des conditions fixées;
- c) l'évaluation de la réaction toxique au moyen de paramètres établis.

D'après certaines observations, le laboratoire effectuant les essais ne devrait pas être obligé de modifier les protocoles d'essais normalisés, et il devrait y avoir au moins trois répétitions d'essais et deux reprises.

Certains ont souligné que la nécessité de normaliser l'évaluation de la toxicité avait amené des compromis dans les trois domaines déjà mentionnés. Ces compromis ont été établis en l'absence de données scientifiques à l'appui. On ne peut apporter d'améliorations sans y consacrer des efforts scientifiques considérables.

On a convenu qu'il était hautement souhaitable d'effectuer des études de phytotoxicité sur le terrain (Wong et Couture, 1986). Dans certains cas, cette approche peut conduire à l'obtention de données valables. Cependant, la variabilité intrinsèque des systèmes naturels complique souvent l'interprétation de ces données (Fairchild *et al.*, 1987). Les méthodes d'évaluation sur le terrain ne sont pas très perfectionnées, c'est pourquoi un bon nombre de membres de l'EPA estiment qu'il ne serait pas raisonnable d'imposer de telles recherches à un fabricant de produits chimiques.

L'EPA doit faire face à un problème important pour tout le processus d'homologation et d'examen des pesticides; en effet, la législation régissant l'EPA stipule actuellement que toutes les fois que cet organisme annule un produit chimique, il lui incombe de dédommager les fabricants de pesticides pour le reste de leur inventaire et pour l'élimination des pesticides. Ainsi, lorsque l'EPA interdit certains pesticides, cet organisme doit envisager de payer des centaines de milliers de dollars puisés à même son budget (en particulier celui du programme des pesticides), sommes qui devraient servir à la réglementation des pesticides (Sun, 1987).

4.2 Lignes directrices de l'OCDE

L'OCDE a exposé certaines considérations générales et certaines préoccupations dans ses lignes directrices (OCDE, 1981). L'une des principales difficultés mises en évidence est de décider si un certain changement ou un certain effet observé sont

significatifs du point de vue écologique. "Ce problème se complique encore, car les systèmes biotiques ont la capacité de réparer les dommages et de s'adapter à des conditions défavorables." Ainsi, il est nécessaire d'identifier les changements irréversibles et les effets réversibles qui, même s'ils sont tolérables, peuvent être inacceptables.

Ni l'OCDE, ni tout autre organisme mentionné dans ce projet n'ont décrit explicitement la relation entre les essais de toxicité et le type de décision mentionné ci-dessus. Par exemple, on observe que les espèces choisies pour l'évaluation doivent être importantes au point de vue fonctionnel; cependant, cette observation n'est pas souvent mentionnée lorsque l'on procède au choix final des espèces (voir les critères du choix des espèces de l'EPA au paragraphe 4.1.1).

Au cours de discussions avec un représentant de l'OCDE, on a constaté que des efforts concertés avaient été faits pour promouvoir et mettre au point des essais portant sur plusieurs espèces à la fois, c'est-à-dire des essais mettant individuellement en jeu plus d'une espèce, par exemple des microcosmes. De tels essais pourraient viser plusieurs des préoccupations concernant l'extrapolation sur le terrain; cependant, comme l'OCDE l'a fait remarquer, ces essais n'atteignent jamais une précision élevée. Par conséquent, ils doivent constituer un compromis entre "une normalisation réalisable sur le plan expérimental et une représentation approximative des conditions naturelles" (OCDE, 1981). Il existe une controverse entre ceux pour qui un tel compromis est possible et ceux pour qui ces essais ne pourront jamais convenir au processus d'homologation.

La position actuelle de l'OCDE est la suivante: en l'absence d'essais multi-espèces perfectionnés, il vaut mieux faire une série d'essais applicables à une seule espèce à la fois, dans des conditions appropriées à chaque espèce, au lieu d'effectuer un essai "très poussé sur une seule espèce". On a fixé des exigences minimales relativement aux méthodes d'essai, mais on utilise dans ces critères des espèces particulières uniquement comme exemple. L'OCDE résume sa position de la façon suivante: "le groupe d'experts désire insister sur le fait qu'en raison de la nature de la "science" de l'écotoxicologie, il est irrationnel d'imposer à tout prix l'utilisation d'une espèce normalisée au cours d'une évaluation environnementale. Agir ainsi suppose une précision qui n'existe pas et qui, en outre, viendrait à l'encontre de l'idée d'un système modèle dans l'évaluation écotoxicologique" (OCDE, 1980).

À la suite d'un atelier qui s'est tenu en 1986, le groupe de travail de l'OCDE sur les cibles d'exposition a convenu de trois principes généraux:

a) Le choix d'espèces visées concentre l'attention sur les sources et les voies d'exposition importantes.

b) Les hypothèses sur la cible peuvent définir la voie d'exposition et modifier les considérations de biodisponibilité.

c) Les données sur les types d'emplois et sur les utilisateurs (cibles) sont interactives (les types d'emplois des pesticides peuvent attirer l'attention sur certains organismes visés non prévus) (OCDE, 1986b).

Il existe plusieurs problèmes spécifiques liés aux lignes directrices de l'OCDE. Ces problèmes ressemblent à ceux qui sont liés aux lignes directrices de l'EPA. Le choix des espèces demeure encore la question la plus problématique; c'est notamment le cas pour les lignes directrices de l'OCDE qui s'appliquent à de nombreux pays, notamment à ceux du tiers monde. Il semble que le choix des espèces ait été examiné par l'OCDE pendant deux ou trois ans, et la liste est encore sujette à controverse. La liste des espèces terrestres est bien plus spécifique que celle donnée dans les dernières lignes directrices de l'EPA des É.-U; certains problèmes peuvent survenir lorsqu'il faut tenir compte d'un bon nombre d'environnements très divers. Le Dr Holst de l'EPA en a donné un exemple. À son avis, la liste de l'OCDE comporte trop d'espèces de brassicas, ce qui reflète l'influence des pays d'Europe du Nord dans les décisions de l'OCDE. Il estime qu'il faudrait choisir des plantes grasses, espèces souvent très importantes dans les environnements du tiers monde.

Le Dr Hugo Van Looy, chef de la Direction des produits chimiques de l'OCDE, a confirmé que le choix des espèces était un problème important. Il a expliqué qu'après une certaine controverse quant au choix des espèces, on avait établi une liste reflétant un consensus. D'après le Dr Van Looy, il n'existe aucune "justification profonde" pour le choix des espèces. On favorise les espèces qui ont déjà été très utilisées dans l'évaluation de la toxicité.

On ne prévoit pas apporter de modifications ni d'ajouts aux lignes directrices actuelles de l'OCDE. On a récemment terminé une étude des 24 pays membres de l'OCDE sur l'expérience acquise avec les essais d'inhibition de la croissance algale (OCDE, 1986a). En général, les pays membres n'ont rencontré aucun problème majeur avec cette méthode. À cette époque, l'ISO préparait un essai normalisé d'inhibition de la croissance algale, et l'OCDE a ainsi estimé qu'il serait peu judicieux qu'elle entreprenne ses propres recherches. On a rencontré plus de difficultés avec l'essai d'inhibition de la croissance de plantes terrestres, car il avait été relativement peu utilisé. Les compétences en la matière sont clairsemées dans quelques laboratoires. L'OCDE n'a pas reçu de demande de révision de cet essai émanant de pays membres. Cependant, le Dr Van Looy tient à souligner que le Japon ne s'est pas montré totalement satisfait. Il n'a pas spécifié les préoccupations particulières des Japonais.

Il n'existe aucun motif pour justifier les critères utilisés par l'OCDE en ce qui concerne le passage du niveau de base au niveau de confirmation. Le rapport interne du Groupe d'étude sur la biodégradation et la bio-accumulation a fourni une explication relative aux termes "non facilement dégradable" et "bio-accumulation significative", deux des critères utilisés pour justifier le passage au niveau de confirmation. Une substance est considérée comme "non facilement dégradable" si les résultats d'une série d'essais sur la biodégradabilité et la dégradation abiotique indiquent que cette substance ne se dégrade pas de façon significative après 28 jours (OCDE, 1979). Les essais de biodégradation comportent une variante de l'essai de sélection de l'OCDE, l'essai MITI, l'essai en bouteille close, la variante de l'essai Sturm et l'essai de l'AFNOR (OCDE, 1979). Si après dix jours la substance s'est dégradée dans une proportion de 50 à 60 p. 100, elle a atteint "le niveau de passage" de la biodégradation. Les essais de dégradation abiotique comportent un essai de photodégradation en phase gazeuse en laboratoire, un essai de photominéralisation en surface et un essai de photodégradation en phase aqueuse. On vérifie le potentiel de bio-accumulation avec des espèces de poissons tant pélagiques que benthiques. Si le facteur de bio-accumulation est supérieur à 1000, il faut alors exiger des essais de confirmation.

En résumé, l'OCDE se montre plus souple que l'EPA des É.-U. dans ses lignes directrices d'évaluation. Elle insiste sur les différences entre "l'évaluation écotoxicologique et les bio-essais" en affirmant sa préférence pour la première méthode. Cet organisme est soucieux d'établir des exigences appropriées pour les essais, mais il s'efforce surtout d'élaborer des essais pouvant servir de modèle en ce qui concerne la réaction des écosystèmes dans leur ensemble. En revanche, l'EPA a décidé de donner de l'importance, grâce à son système à plusieurs étapes, aux essais qui déterminent les seuils de toxicité et qui évaluent la toxicité relative des produits chimiques dans des conditions rigoureusement contrôlées. Il est possible de déduire la réaction de l'écosystème; cependant, l'EPA des É.-U. tient à souligner qu'il faut simuler trop de facteurs de régulation des populations naturelles dans un simple essai de laboratoire (étape 1, étape 2) (Holst et Ellwanger, 1982).

4.3 Communauté économique européenne

Aux dires du Dr Patrick Murphy de l'Office de la protection de l'environnement, Direction des produits chimiques de la CEE, la CEE effectue actuellement un essai en anneau sur une variante améliorée d'un protocole d'essai recommandé par l'OCDE pour l'inhibition de la croissance des plantes. Cet essai ne sera pas terminé avant la fin de

l'année 1988, et il faudra encore une autre année pour élaborer une nouvelle directive. La CEE a récemment approuvé une méthode d'évaluation applicable aux algues qui est une version "légèrement modifiée" de l'essai d'inhibition de la croissance algale de l'OCDE (section 3.6). Le D^r Murphy a fait remarquer que la CEE demandait une évaluation progressive des produits chimiques industriels. Cette série d'essais est basée sur la quantité de produit rejeté dans l'environnement.

Selon le D^r Murphy, l'une des principales difficultés qui se pose à la CEE lors de l'élaboration d'exigences relatives aux essais est toujours le choix entre (a) accorder une grande souplesse quand on décide, cas par cas, de l'essai à exiger d'après le type d'emploi et le type de produit chimique ou (b) fixer une série d'essais obligatoires, le fabricant devant justifier la raison pour laquelle il n'a pas effectué ces essais. Le choix entre ces deux options dépend du personnel et des ressources financières de l'organisme de réglementation. Selon le D^r Murphy, ce sont les mêmes personnes qui devraient toujours prendre les décisions concernant l'évaluation si on veut assurer une uniformité.

Le D^r Murphy a également insisté sur un autre problème, soit l'absence de méthodes d'évaluation. En outre, il a fait ressortir le faible niveau de confiance des extrapolations faites pour les autres espèces non évaluées ainsi que l'absence quasi totale de recherches reliant à l'environnement les essais applicables à une seule espèce.

4.4 Agence nationale pour la protection de l'environnement (Danemark)

Nous avons demandé à M. L. Martenson et à M. Klaus Hansen de nous faire part de leurs commentaires sur leur expérience en matière d'évaluation de plantes non visées. Comme l'a signalé le D^r Murphy de la CEE, il n'existe aucune réglementation courante sur les pesticides parmi les pays membres de la CEE. Au Danemark, il n'existe actuellement aucune exigence visant les essais sur des plantes vasculaires non visées pour l'homologation des pesticides. On exige des essais d'inhibition de la croissance des algues et on utilise le protocole de l'OCDE. Selon M. Hansen, les données sur l'efficacité fournissent beaucoup de renseignements sur les plantes. Les principaux problèmes mis en évidence par l'organisme danois ont été l'absence d'essais appropriés pour évaluer les effets sur la reproduction et d'autres effets fonctionnels, ainsi que la difficulté de passer aux essais sur le terrain.

4.5 Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)

Dans un rapport sur l'uniformisation à l'échelle internationale des exigences visant l'homologation des pesticides, la FAO a appuyé la nécessité d'obtenir des données

sur la toxicité pour divers organismes non visés (FAO, 1982). Cependant, elle n'a pas mentionné spécifiquement des plantes non visées. Là encore, le choix des espèces a été considéré comme une étape décisive. D'après les recommandations de la FAO, il faut choisir très soigneusement les espèces à évaluer afin de justifier les prévisions globales pour l'environnement qui sont effectuées à partir des résultats d'un programme d'évaluation réalisable. La FAO affirme qu'il est possible de faire des extrapolations d'une espèce à l'autre, même si ces extrapolations sont nettement plus fiables lorsque les espèces sont étroitement apparentées. La FAO a également prescrit un contrôle après l'homologation dans le cadre du processus d'évaluation des incidences sur l'environnement (EIE).

5 ÉVALUATION DES ESSAIS UTILISÉS DANS LES PRÉSENTES LIGNES DIRECTRICES

5.1 Commentaires des personnes interrogées

Le tableau 2 (chapitre 2) donne les résultats d'ensemble du questionnaire (en annexe). Ce dernier a été adressé à différentes personnes des secteurs de l'agriculture, de l'environnement, des forêts et de l'industrie. Quarante pour cent des questionnaires ont été complétés et remis.

5.1.1 Portée des essais présentement employés. - Certaines personnes interrogées sont d'avis que les essais présentement recommandés (inhibition de la germination des semences et/ou de l'émergence des semis, vigueur végétative, inhibition de la croissance des plantes aquatiques, principalement avec *Selenastrum* et *Lemna*) constituent une bonne source d'informations de base. On a vanté la valeur de ces essais pour donner une indication de la tolérance à des stades sensibles du cycle biologique (germination des semences et émergence des semis), pour s'appliquer directement à la régénération naturelle à partir de la production de semences sur le terrain et pour constituer un indicateur efficace de la sensibilité potentielle des plantes et de représentants d'autres taxons arrivés à maturité. Les essais avec *Lemna* ont été recommandés non seulement parce que ces plantes sont sensibles aux herbicides non polaires dans l'eau, mais qu'elles donnent également une indication des effets physiques exercés par les produits en couche pelliculaire. Certaines personnes ont cependant formulé des réserves, en insistant, par exemple, sur le choix méticuleux d'espèces représentatives et sur l'interprétation prudente et intelligente des résultats. Selon un des répondants, les essais "sont bons et valides; ils conduisent à une évaluation préliminaire de l'activité générale des produits chimiques en peu de temps et à peu de frais et ils sont répétables. Ils montrent le mode d'action des substances testées et sont en partie applicables sur le terrain".

Les critiques du présent système d'essais pensent que ceux-ci ont une portée trop étroite. Beaucoup de commentaires portent sur le choix des espèces. On insiste sur l'importance de pouvoir choisir des sujets à l'intérieur d'une vaste gamme taxinomique; ceci comprend les espèces représentatives sur le plan écologique (on ne considère pas que *Selenastrum* appartient à ce groupe) et les taxons indigènes. Certains s'interrogent également sur le choix des souches à l'intérieur d'une espèce donnée. Plusieurs commentaires ont porté sur la valeur de *Lemna* comme espèce indicatrice; on pense généralement que ce genre ne fournit pas des résultats qu'on peut appliquer aux macrophytes submergés ou flottants.

D'autres répondants trouvent qu'il faudrait inclure dans les présents essais des effets à différentes étapes du cycle biologique ou durant différentes étapes métaboliques ou mitotiques. Un répondant trouve que les essais sont limités à des effets manifestés à l'intérieur d'une plage étroite de concentrations chimiques. Un autre pense que les essais devraient indiquer les résultats d'une exposition à court terme au milieu aquatique contaminé par la dérive de pesticides et par une faible dose de pesticides. Dans l'ensemble, les personnes interrogées mettent en doute la correspondance entre ces essais et la situation sur le terrain; les effets variables d'une espèce à l'autre ont été mentionnés comme l'un des facteurs de confusion lorsqu'une extrapolation des résultats aux conditions sur le terrain est tentée.

Une des lacunes dans la portée des présents essais est le choix des espèces forestières. Ces essais sont considérés comme n'étant "absolument pas représentatifs des conditions en milieu forestier".

5.1.2 Reproductibilité des essais. - La plupart des répondants sont satisfaits de la reproductibilité des essais présentement recommandés. Les commentaires vont d'excellents à "bons dans tout laboratoire". Les quantifications des variations varient entre 10 et 25 p. 100. Une réserve souvent formulée est qu'il faut du personnel expérimenté pour atteindre à un haut niveau de reproductibilité. En outre, les personnes interrogées insistent sur le fait qu'il faut contrôler les conditions d'expérience, assurer une bonne surveillance et contrôler les milieux, le mode de nutrition ainsi que les sources de semences ou de plantes. Plusieurs insistent sur l'importance de travailler avec des cultures axéniques. On insiste également sur la nécessité de s'approvisionner d'une collection normalisée de spécimens dont la taxinomie est parfaitement connue; cela permettrait de régler les problèmes éprouvés avec les variations du biotype et les variations d'une espèce à l'autre. Les personnes interrogées considèrent que les essais synchronisés avec des cultures axéniques d'algues unicellulaires ont "une forte reproductibilité". Une d'elles préfère les tests sur les algues en microplaques.

Le problème le plus commun semble provenir des erreurs introduites par un personnel inexpérimenté. En outre, il semble que trop de gens emploient des cultures qui ne sont pas normalisées; on pense ainsi à "*Chlorella* c". Quelqu'un rapporte que les résultats obtenus avec des produits chimiques de qualité technique diffèrent beaucoup de ceux obtenus avec des produits formulés.

Un problème particulier a été rapporté avec les essais d'inhibition de la germination des semences et de l'émergence des semis. Il semble que ceux avec les

semences donnent des résultats variables même quand les semences proviennent du même endroit ou du même lot de semences d'arbres.

5.1.3 Avantages et inconvénients des présents essais. - Les avantages le plus communément cités, par ordre de préférence, sont: le coût peu élevé, la simplicité, la reproductibilité, la rapidité, la sensibilité et le peu d'espace de laboratoire occupé ainsi que l'appareillage sommaire. Pour certains, les présents essais permettent de tester les cultures sensibles en laboratoire et sur le terrain et offrent la possibilité d'obtenir des renseignements sur les modes primaires et secondaires d'activité ainsi que sur les mécanismes de résistance.

L'inconvénient le plus communément cité est la difficulté d'extrapoler les résultats des essais à la situation sur le terrain. Un inconvénient très précis est que de nombreux essais ne peuvent fournir une image représentative de l'exposition à long terme à des doses sublétales; "beaucoup d'essais donnent des résultats qui se rapportent aux effets à court terme de composés solubles et négligent les effets à long terme liés au substrat". Dans l'ensemble, les personnes interrogées considèrent que les essais ne sont pas assez représentatifs de la situation sur le terrain. Quelqu'un a résumé cela d'une façon succincte: ces essais permettent d'accumuler beaucoup de résultats qui n'ont aucun rapport avec la situation réelle. Plusieurs commentaires ont porté sur des aspects particuliers d'essais précis. Les différences clonales et la mutation des clones en laboratoire constituent un des problèmes identifiés. Parmi d'autres, il faut mentionner le peu de bases de données de référence, le manque de personnel expérimenté et les carences en équipement (particulièrement des compteurs électroniques de particules). Une personne affirme qu'il faut au moins 300 graines pour resserrer les écarts types dans les essais d'inhibition de la germination: toutes les graines devraient avoir la même provenance si possible. Les personnes interrogées considèrent que les différences de provenance sont importantes et qu'elles nuisent également à la vigueur des semences et des semis.

5.1.4 Paramètres à évaluer préférés pour les essais de phytotoxicité. - Les paramètres à évaluer qui sont recommandés pour les essais avec des plantes vasculaires varient considérablement d'une personne interrogée à l'autre. La seule recommandation assez commune est à l'effet qu'il faut mesurer la "croissance". Aucune des personnes n'a décrit en détail de quelle façon on peut la mesurer effectivement. D'autres suggestions ont été faites, notamment le pourcentage de germination et la durée jusqu'à l'émergence, le rapport entre la hauteur et la masse, le rendement en g/m², etc., la mort ou la nécrose

des tissus et la survie. Quelqu'un a insisté sur le fait que les essais devraient se prolonger au-delà de l'étape de la germination s'il faut calculer un niveau sans effet, parce que certains pesticides exercent leur action à des étapes ultérieures de la croissance. On a mentionné la possibilité de noter les changements dans la morphologie et l'anatomie des plantes, mais des exemples précis des changements à considérer n'ont pas été apportés. La mesure de facteurs physiologiques a été jugée intéressante par certaines personnes; la fixation du CO_2 , l'assimilation du carbone, la production d'oxygène, la teneur en chlorophylle et l'examen des systèmes enzymatiques fondamentaux ont été proposés. Enfin, une personne pense que la bio-accumulation doit être mesurée. Elle recommande également de recueillir des données sur les produits du métabolisme et le degré de récupération des organismes ainsi que des renseignements précis sur les modes primaires et secondaires d'activité ainsi que sur la résistance.

Les paramètres à évaluer qui sont suggérés pour les essais avec *Lemna* comprennent la masse sèche et la masse fraîche, la teneur en chlorophylle, la croissance par le dénombrement des frondes, la mortalité et la "multiplication" (nous supposons que cela signifie également le dénombrement des frondes).

Le paramètre le plus communément suggéré pour les essais avec des algues est la croissance. On insiste sur le taux de croissance et non seulement la croissance. Une des personnes interrogées recommande que celui-ci soit mesuré en cultures non sélectives (milieu complet) par lots, mais que les caractéristiques du système à l'équilibre devraient constituer le paramètre de surveillance avec les cultures sélectives en dynamique. On a suggéré d'autres mesures physiologiques comme la teneur en ^{14}C ou en ATP après une exposition de quatre heures ou encore des dénombrements ou la fluorescence après une exposition de 96 heures. Une des personnes interrogées dit qu'elle ne croit pas que les effets sur les algues constituent un problème assez important pour qu'on procède à des essais élaborés.

5.1.5 Suggestions "d'espèces indicatrices". - Cette question est une de celles qui a suscité les réponses les plus variées. Cela témoigne de la difficulté inhérente au choix des espèces et fait écho aux préoccupations et aux controverses décrites par le Dr Holst de l'EPA des É.-U. (chapitre 4).

Les listes les plus précises d'espèces vasculaires terrestres recommandées proviennent de personnes intéressées par la foresterie. Les principales espèces exploitables recommandées sont *Pinus strobus* (pin blanc), *Pinus banksiana* (pin gris), *Pinus contorta* (pin Lodgepole), *Picea mariana* (épinette noire), *Picea sitchensis* (épinette de

Sitka), *Thuja occidentalis* (thuya occidental), *Thuja plicata* (thuya géant), *Pseudotsuga menziesii* (sapin de Douglas), *Abies* (sapin) et *Tsuga* (pruche). Les principales espèces "indésirables" ou sans valeur commerciale qui ont été recommandées sont *Populus tremuloides* (peuplier faux-tremble), *Prunus virginiana* (cerisier de Virginie), *Cornus stolonifera* (cornouiller stolonifère), *Alnus* (aulne), *Betula* (bouleau), *Salix* (saule), *Rubus* (framboisier, ronce remarquable, ronce occidentale) ainsi que les "graminées".

Les autres recommandations concernant les plantes terrestres sont d'ordre général. Des représentants des monocotylédones, des dicotylédones ainsi que d'une "série d'espèces cultivées" sont proposés. Une des personnes interrogées donne le chou, le mil, le seigle, le blé et la laitue.

La plante aquatique vasculaire le plus souvent recommandée est *Lemna*. Certaines personnes interrogées croient que des macrophytes enracinés immergés ou flottants doivent être inclus; *Typha latifolia* et *Potamogeton* spp. sont suggérés. Quelqu'un recommande de choisir des espèces parmi les renonculacées et la sagittaire; ces plantes sont faciles à échantillonner, poussent bien en laboratoire et sont trouvées partout au pays. Une autre personne concentre son choix sur des plantes des terres humides de l'ouest du Canada; elle suggère *Myriophyllum exalbescens* à cause de son importance pour les invertébrés aquatiques ainsi que *Potamogeton pectinatus* à cause de son importance pour la sauvagine.

Presque toutes les personnes qui ont commenté le choix des algues ont fourni une liste de plusieurs espèces plutôt qu'une seule. En général, des représentants de chacune des divisions taxinomiques sont suggérés, particulièrement des algues vertes, des diatomées et des cyanobactéries. Les microflagellées sont également mentionnées ainsi que les chrysophytes marines et les dinoflagellées. Parmi les genres recommandés, il y a: *Selenastrum*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Asterionella*, *Tabellaria*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Mougeotia* et *Stigeoclonium*. Une des personnes dit "qu'il n'y a aucune raison ni justification pour tester les espèces aquatiques ou les plantes de rivage; il n'y a tout simplement pas de risque mesurable dans ces cas".

Parmi les recommandations les plus fréquentes, il est dit que les espèces utilisées doivent pouvoir être multipliées ou cultivées aisément en laboratoire, être facilement disponibles, être distinctes sur le plan taxinomique et être bien représentées dans les communautés naturelles. Une personne fait remarquer que les algues les plus importantes sur le plan écologique sont souvent des espèces qui se gardent mal en culture.

Certains répondants n'aimaient pas l'idée de limiter les essais à quelques espèces "indicatrices". Ils insistent sur les importantes variations spécifiques dans les

réactions aux pesticides, dans la bio-accumulation et dans le transport des toxiques ainsi que sur les variations en importance des espèces d'une région à l'autre. Une des personnes interrogées dit qu'elle "trouve téméraire de vouloir suggérer des espèces indicatrices pour l'environnement canadien. Presque chaque herbicide a un spectre différent d'activité sur toutes les espèces végétales qu'il rencontre. Les différentes espèces végétales ont une importance variable selon les situations." Cette personne explique que son équipe choisit des espèces appropriées aux pesticides testés, c'est-à-dire des espèces tolérantes, intermédiaires et très sensibles.

En résumé, il y a une forte divergence d'opinions quant au choix des espèces servant aux essais de toxicité. Un point intéressant à noter, c'est la totale dicotomie des points de vue adoptés par les forestiers et par les biologistes de l'eau quant à la nécessité de tester des plantes aquatiques.

5.1.6 Opinions sur l'approche des essais par étapes. - La plupart des personnes interrogées qui se disent en mesure d'apporter des commentaires sont d'avis que c'est une bonne approche. Parmi les questions et les réserves formulées: "Où en est-on rendu avec l'homologation? Il s'agit d'une bonne méthode pourvu qu'on puisse interpréter les résultats à chaque étape et qu'on ait des déclencheurs (valeurs de référence) bien définis. Il faut faire preuve d'autant de prudence dans la constitution d'un système canadien que les Américains pour la constitution du leur." L'expérience d'un des répondants lui a appris que la toxicité des pesticides sur le terrain est souvent bien différente de ce qu'elle est en laboratoire; dans la plupart des cas, elle est moins prononcée sur le terrain.

Un des répondants est d'avis que l'approche par étapes est une erreur, parce que le système donne lieu à l'apparition de "faux négatifs", ce qui risque de conduire à l'homologation de beaucoup de produits chimiques qui devraient être refusés. Sa préférence va aux tests simultanés sur le plus grand nombre possible d'espèces.

5.2 Comparaison des lignes directrices du FIFRA (É.-U.) et de celles établies en vertu du TSCA (É.-U.)

Les lignes directrices du *Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act* (FIFRA, 1986) exigent la tenue d'essais pour l'homologation des pesticides qui diffèrent de plusieurs façons de ceux requis pour mesurer les effets écologiques par le *Toxic Substances Control Act* (TSCA) dans les règles à suivre pour les essais sur des produits chimiques précis; ces règles sont promulguées en vertu de l'Article 4(a) du TSCA (1987a, b). Toutes les substances chimiques potentiellement toxiques sont visées par cette loi.

Il existe une différence fondamentale entre ces deux ensembles de lignes directrices: celles du TSCA prévoient la tenue d'essais pour évaluer la plage de nocivité en vue de la tenue d'essais définitifs de toxicité. Ces essais préliminaires sont faits à plusieurs concentrations. À l'inverse, les essais de l'étape 1 du FIFRA peuvent être faits à une seule concentration, habituellement la concentration maximale indiquée par le fabricant sur l'étiquette du produit. On voit ici que les objectifs cherchés ne sont pas les mêmes; le TSCA vise un groupe de produits chimiques beaucoup plus vaste, diversifié et moins bien connu que l'autre groupe.

Fondamentalement, les deux ensembles de lignes directrices se ressemblent; cependant, celles découlant du TSCA sont généralement plus détaillées que les autres. Par exemple, le protocole expérimental des essais d'inhibition de la croissance des algues comportent des instructions pour l'analyse poussée de certains effets comme les changements relatifs du nombre de cellules, de taille ou des deux, les malformations, la couleur, la floculation, l'adhérence aux parois ou l'agréation (TSCA, 1982). Le TSCA prévoit que la température doit être enregistrée tout au long des essais et que le pH doit être enregistré mais non ajusté, car cela peut parfois modifier la toxicité. On y prévoit également des méthodes permettant de faire la distinction entre les effets algistatiques et les effets algicides (essai au bleu d'Evans ou repiquage de cellules dont la croissance est inhibée). L'essai de germination des semences et d'allongement des racines prévu par le TSCA précise que les semences doivent appartenir à la même classe de taille et qu'il faut indiquer leur provenance. Dans l'essai de croissance hâtive des semis, le substrat des racines doit être inerte, comme du sable quartzeux ou des billes de verre, mais ne doit pas être de la terre. Il est recommandé d'utiliser une solution modifiée de Hoagland à mi-concentration comme milieu de culture pour les essais de croissance des semis. En outre, les conditions suivantes du milieu sont précisées (elles ne le sont pas dans le protocole du FIFRA):

- Teneur en gaz carbonique de 350 ± 50 ppm.
- Éclairement de $350 \text{ E/m}^2/\text{s}$ à 400-700 nm à l'aide d'un système mixte à fluorescence et incandescence ou d'un système à décharge à haute intensité avec lampes à halogénure de métal ou une combinaison de lampes à halogénure de métal et de lampes sodium haute pression, et photopériode de 16 h d'éclairement et 8 h d'obscurité.
- Température de 25 ± 3 °C le jour et de 20 ± 3 °C la nuit.
- Humidité entre 65 et 85 p. 100 durant la période d'éclairement, et près du point de saturation durant la période d'obscurité (TSCA, 1982).

Dans le TSCA, le choix d'espèces est beaucoup mieux justifié. Ainsi, *Selenastrum capricornutum* a été choisie comme espèce d'algues pour les essais en eau douce parce qu'elle est un excellent organisme d'eau douce pour les essais en laboratoire, facile à garder en culture et à dénombrer. C'est aussi un organisme sensible et consistant dans sa réponse à une vaste gamme de concentrations d'éléments nutritifs. Lorsque cet organisme est inclus dans les essais préliminaires de toxicité sur plusieurs espèces, on a trouvé que c'est un organisme comparativement sensible. Le TSCA fournit une brève revue de la documentation portant sur les essais de sensibilité relative de *Selenastrum*. En général, cette espèce s'est révélée au moins aussi sensible que différentes espèces de poissons et d'invertébrés à différents produits chimiques toxiques (TSCA, 1982). En outre, *Selenastrum* a été régulièrement plus sensible que *Scenedesmus* ou *Chlorella*, deux autres algues proposées pour les essais sur les algues.

Skeletonema costatum a été choisie comme algue marine parce qu'elle est souvent citée dans les articles faisant état de bio-essais et qu'elle est un organisme recommandé pour ces derniers (TSCA, 1982). Elle s'est révélée aussi sensible que *Selenastrum* à 35 polluants d'intérêt prioritaire et à deux esters de phtalate lors d'essais de sélection sur plusieurs espèces. Cette espèce s'est révélée plus sensible aux BPC et aux produits de chloration dans les eaux usées que toute une gamme d'algues d'eau douce et d'algues marines.

Il est prévu dans le *Toxic Substances Control Act* que d'autres espèces peuvent remplacer l'une ou l'autre de ces deux algues lorsque c'est approprié, c'est-à-dire lorsqu'on est en présence d'autres espèces qui constituent une population plus à risque que les deux espèces recommandées.

Les espèces désignées dans le TSCA pour les essais sur les plantes terrestres sont:

- Lycopersicon esculentum* (tomate)
- Cucumis sativus* (concombre)
- Lactuca sativa* (laitue)
- Glycine max* (fève soja)
- Brassica oleracea* (chou)
- Avena sativa* (avoine)
- Lolium perenne* (ivraie vivace)
- Allium cepa* (oignon commun)
- Daucus carota* (carotte)
- Zea mays* (maïs)

Ces espèces ont été choisies pour les raisons suivantes: elles ont une grande importance économique; leur distribution, leur abondance et leur représentation taxinomique permettent de couvrir une bonne partie du règne végétal; elles sont sensibles à beaucoup de substances toxiques et ont servi jusqu'à un certain point lors d'essais biologiques précédents; il y a compatibilité entre les conditions de croissance dans le milieu et les contraintes chronologiques imposées par les méthodes d'essais; enfin, elles sont également désignées dans les lignes directrices du FIFRA (TSCA, 1982). Au besoin, d'autres espèces peuvent être utilisées à la place de l'une ou de toutes ces espèces. Par exemple, des espèces sylvoicoles ou déserticoles peuvent constituer des populations plus à risque que les espèces recommandées.

L'organisme chargé de l'application du TSCA a fait sa propre évaluation de la compatibilité de ses lignes directrices avec celles du FIFRA; trois grandes différences sont apparues pour ce qui est des essais de germination et de croissance des semis. En premier lieu, l'essai prévu dans le TSCA précise que les plantes doivent pousser dans une solution nutritive sur un substrat constitué de sable ou de billes de verre. Il n'y a pas d'exigence précise dans le FIFRA pour la tenue des essais; dans la plupart des cas, des sols sont utilisés pour la croissance des plantes. À l'inverse, la justification donnée pour les essais prévus par le TSCA est que les sols constituent un mauvais choix parce que les produits chimiques testés sont probablement adsorbés sur les particules du sol et qu'ainsi, ils passent en moindre quantité dans les plantes. L'essai prévu dans le TSCA est conçu de façon à maximiser l'exposition des plantes aux produits chimiques, et il est donc plus sensible que l'autre. La deuxième différence, c'est que l'essai exigé par le FIFRA ne prévoit que la pulvérisation seulement des pesticides sur les feuilles. Le TSCA prévoit l'application des produits chimiques à l'état solide, liquide ou gazeux sur le feuillage. Le recours à ces modes additionnels d'application permet de tester les produits chimiques dans différents états physiques. La troisième différence tient à ce que l'essai exigé par le FIFRA utilise la moitié moins de plantes, alors que l'essai exigé par le TSCA en requiert un nombre suffisant pour annuler la variabilité entre plantes.

Les responsables de l'application du TSCA ont également comparé leurs essais aux lignes directrices de l'OCDE. Les deux approches sont semblables; cependant, il existe une différence importante quant au choix du substrat. Comme dans le cas du FIFRA, l'OCDE spécifie que le produit chimique à tester doit être mélangé au sol. Dans l'esprit des rédacteurs du TSCA, lorsque des sols sont utilisés, "une pléiade de facteurs édaphiques ne seraient pas vérifiés et accroîtraient la variabilité des résultats des essais". Les auteurs du TSCA n'acceptent pas non plus la recommandation de l'OCDE de pratiquer des

dilutions en série des produits chimiques avec un substrat non homogène. Il est douteux qu'on puisse obtenir des dilutions précises de cette façon, et en outre, les propriétés physicochimiques du mélange de sols et de produits chimiques ne resteraient pas uniformes au fur et à mesure des dilutions, car des dilutions progressives se traduisent par une augmentation du pourcentage de sable dans les mélanges de sols.

Dans les documents de soutien technique du TSCA, des exemples de commentaires sur les lignes directrices prévues à la loi sont fournis (TSCA, 1981a, b, c). Une des critiques formulées porte sur le fait que les plantes utilisées pour les essais d'inhibition de la germination et de la croissance sont des angiospermes d'importance commerciale et ne sont pas représentatives des écosystèmes naturels. Les auteurs du TSCA font alors remarquer que les présentes normes permettent de choisir d'autres espèces qui ont de l'importance économique ou écologique dans la région visée. Une autre critique porte sur le fait que la méthodologie des essais couvre une très petite partie du cycle biologique. Les auteurs du TSCA répondent en faisant remarquer que leurs normes pour les essais d'assimilation et de translocation peuvent servir à évaluer les effets chimiques sur certains processus du développement comme la floraison ou la formation des graines et que des essais portant sur tout le cycle biologique des plantes sont en voie de développement. Certains critiques sont d'avis que le fait d'utiliser un sol traité avec le produit chimique testé constitue une meilleure représentation de la réalité. Les auteurs du TSCA répondent en disant qu'ils doivent être en mesure d'évaluer le risque qui correspond au scénario du "pire cas possible", et qu'à cause de la variabilité des propriétés physiques et chimiques des sols naturels, il importe d'utiliser des matières inertes si on veut éliminer les sources de variations dans les tests.

5.3 Évaluation des essais présentement employés et des essais de rechange

5.3.1 Essais toxicologiques pour les algues. - Souvent, les chercheurs ne participent pas à l'établissement des protocoles; c'est un inconvénient majeur quand on tente d'optimiser un système. Pour combler cette lacune, il a été décidé de fournir de la documentation de fond sur les essais de toxicité aquatique de façon à faire comprendre la justification rationnelle de nos recommandations.

5.3.1.1 Indicateurs de toxicité. - Il y a différentes façons d'évaluer l'inhibition des processus biologiques par intoxication. Les modes d'inhibition qui font intervenir de nombreuses étapes biochimiques comme le taux de croissance peuvent constituer de bons indicateurs de la toxicité. L'inhibition de processus précis, comme le cycle du transport

photochimique des électrons, et de processus biochimiques de complexité intermédiaire, comme l'assimilation des éléments nutritifs, peut également être utilisée. Le fonctionnement de ces processus peut être déterminé à l'intérieur du système biologique lui-même ou encore par les effets dans le milieu environnant qui sont parfois assez prévisibles pour pouvoir servir d'indicateurs de toxicité. Il est à mentionner que les mesures indirectes de la croissance, comme par la chlorophylle *a*, l'ATP, les protéines, le RNA et le DNA, ne sont valides que si la croissance est équilibrée, c'est-à-dire que le doublement de la biomasse doit se traduire par le doublement de toute substance chimique constituante.

5.3.1.2 Bio-accumulation. - La mesure de la bio-accumulation offre un choix plus restreint de processus "indicateurs"; on est généralement limité à l'assimilation ou à la disparition d'une substance toxique.

5.3.1.3 Contraintes liées aux essais. - Il faut savoir dans quelle mesure les contraintes imposées par le système des essais entament la validité de l'évaluation de la toxicité; c'est à ce prix qu'on peut obtenir des résultats significatifs. Il importe d'évaluer soigneusement ces contraintes avant de rédiger des directives et d'établir de manière formelle les protocoles d'essais.

Il y a deux grands types de contraintes:

- a) les contraintes chimiques,
- b) les contraintes biologiques.

Le lecteur trouvera dans les paragraphes qui suivent comment ces contraintes influencent la réaction des algues aux substances toxiques.

CONTRAINTES CHIMIQUES. - Depuis une dizaine d'années, les contraintes chimiques ont reçu beaucoup d'attention, et les législateurs commencent à comprendre qu'il faut également tenir compte de cet aspect du problème. Un pourcentage élevé de travaux publiés sur la toxicité ont été invalidés par le fait que le pH, la composition en éléments nutritifs et la capacité de complexation des matières organiques étaient inconnus (la recherche sur la toxicité des métaux a fait l'objet d'une révision par Campbell et Stokes, 1985). Sur ce plan, il y a eu davantage de travail fait sur les métaux que sur les autres substances, mais les concepts dégagés s'appliquent à toute substance toxique.

Un exemple avec le cadmium et le cuivre servira à bien illustrer l'importance de la répartition des espèces d'une substance toxique et de l'effet d'une variable chimique (tiré de Peterson et al., 1984):

On a choisi le cadmium, un métal ayant des réactions chimiques simples dans l'eau, pour éviter d'avoir des complications avec des variations dans la

répartition des espèces. En outre, le milieu a été complètement défini et ne contient pas de matières organiques. La répartition de l'ensemble des composants du cadmium pouvait donc être établie avec certitude à l'intérieur de la plage de pH choisie.

La figure 3 donne en A la répartition des composants chimiques du cadmium; on y voit que celle-ci reste virtuellement la même à l'intérieur de la plage de pH indiquée. La figure 3 montre en B l'inhibition à 50 p. 100 de l'assimilation du phosphore par une algue verte. On y voit qu'à un pH de 5,5, il faut près de 200 fois plus de Cd qu'il n'en faut à un pH de 8,5 pour inhiber de 50 p. 100 l'assimilation du phosphore. L'important écart de toxicité en fonction du pH ne peut donc être attribué à un changement dans la répartition des composants du cadmium. Le rapport entre la toxicité du cadmium et le pH est donc très fort (figure 3C). Ainsi, Peterson *et al.* (1984) sont parvenus à la conclusion que la concurrence entre les ions hydrogène et cadmium pour occuper les sites réactifs sur les parois cellulaires fait que le Cd occupe davantage de sites et devient donc de plus en plus toxique à mesure que la concentration en ions hydrogène diminue.

La figure 4 montre des données semblables pour le cuivre. L'ensemble des composants du cuivre en solution est dominé par les ions métalliques libres à bas pH et par les complexes inorganiques à pH élevé (figure 4A). La quantité de cuivre nécessaire pour inhiber de 50 p. 100 l'assimilation du phosphore diminue à mesure que le pH passe de 5,5 à 6,5 et ensuite, reste relativement constante à un pH supérieur. Peterson *et al.* (1984) sont parvenus à la conclusion que la toxicité observée pouvait être expliquée de la façon la plus simple en considérant l'ion cuivrique seulement, qui concurrence l'ion hydrogène, un peu à la façon de l'ion cadmium. Le cuivre garde la même toxicité entre un pH de 7 et un pH de 8,5 malgré une réduction importante du nombre d'ions cuivriques libres, parce que la toxicité de l'ion cuivrique augmente à un pH plus élevé.

Cette étude avait minimisé les effets des variables autres que le pH; l'introduction de matières organiques et d'autres ions métalliques complique le modèle simple précédent. Cependant, faute de savoir quels facteurs il est essentiel de contrôler dans les expériences sur la toxicité, les résultats n'ont aucune signification. Il faut insister sur le fait que plus l'essai est long et que plus la population de microorganismes est importante, plus grande est la probabilité d'obtenir des changements induits par les microorganismes, par exemple, le dégagement en quantité importante de métabolites extracellulaires et la dérive du pH.

CONTRAINTES BIOLOGIQUES. - La toxicité chez les microorganismes dépend d'un bon nombre de facteurs:

- a) caractéristiques morphologiques comme le rapport entre la superficie et le volume, le type de croissance, soit unicellulaire, en colonies ou en filaments;
- b) position dans la taxinomie;
- c) production ou non de mucilage;

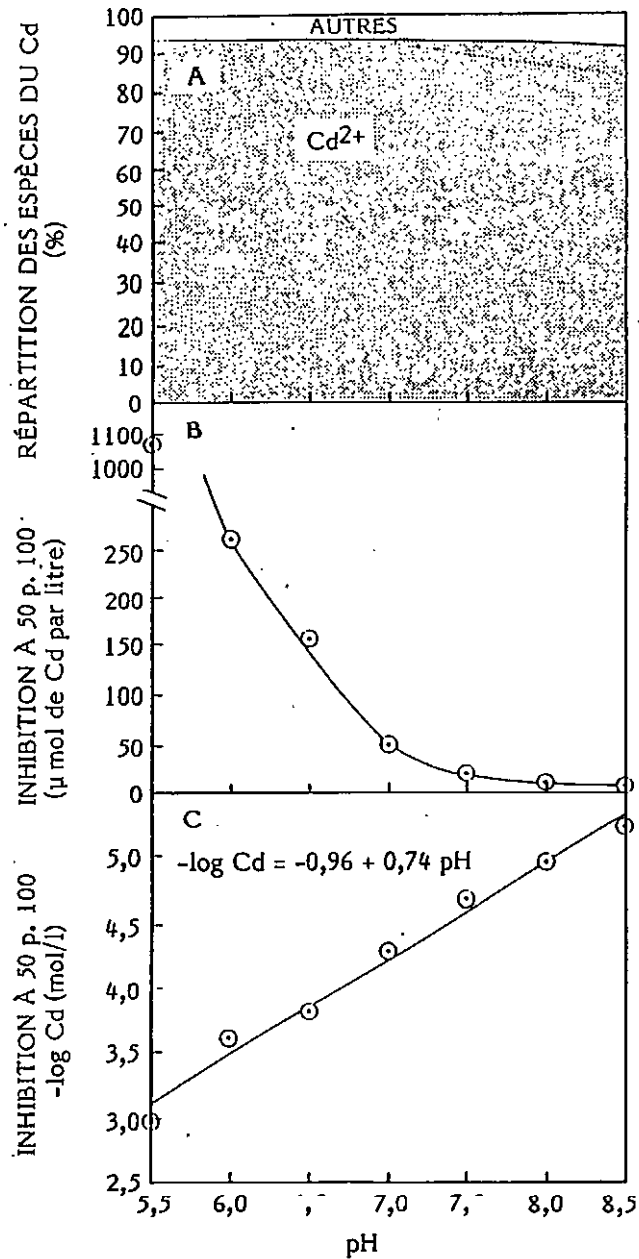


FIGURE 3

A. RÉPARTITION DES ESPÈCES DU Cd EN FONCTION DU pH (l'aire désignée par "Autres" représente les complexes inorganiques du Cd porteurs ou non d'une charge)

B. QUANTITÉ DE Cd DISSOUS TOTAL POUR UNE INHIBITION À 50 p. 100 DE L'ASSIMILATION DU P CHEZ *S. QUADRICAUDA*, EN FONCTION DU pH (valeur déterminée graphiquement d'après la figure 2)

C. LOGARITHME NÉGATIF DE LA TENUEUR EN Cd DISSOUS TOTAL QUI PROVOQUE UNE INHIBITION À 50 p. 100 DE L'ASSIMILATION DE P EN FONCTION DU pH

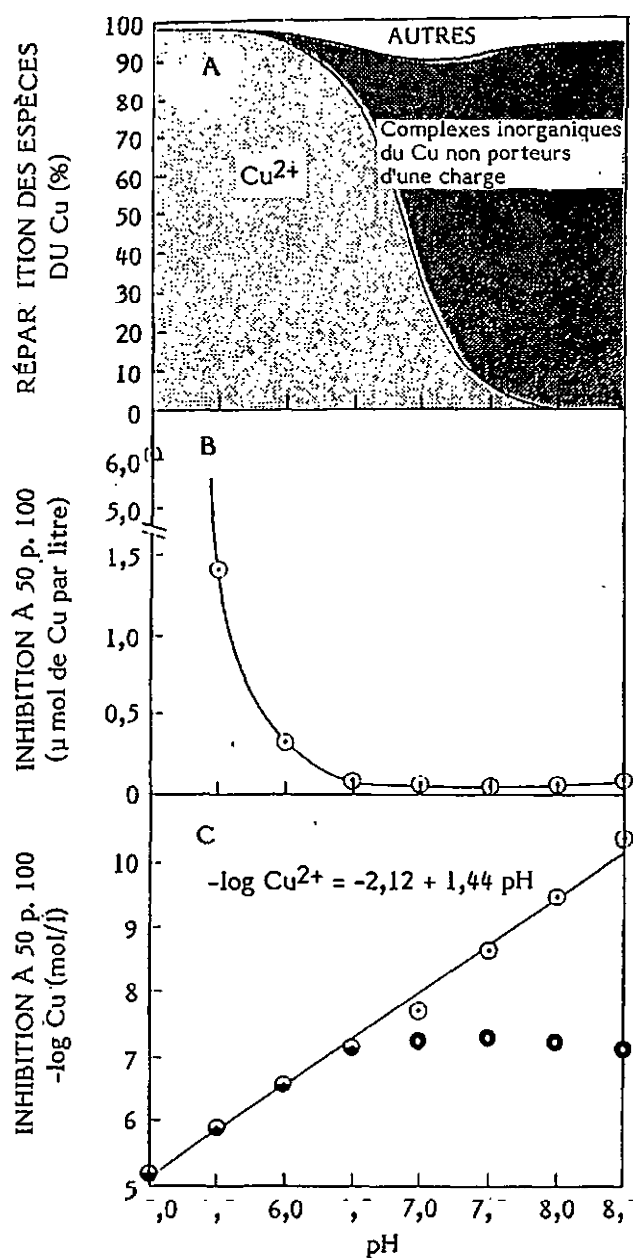


FIGURE 4

A. RÉPARTITION DES ESPÈCES DU Cu DISSOUS EN FONCTION DU pH (les complexes inorganiques du Cu non porteurs d'une charge étaient composés principalement de $\text{Cu}(\text{OH})_2^0$ et de CuCO_3^0 ; l'aire désignée par "Autres" représente les complexes inorganiques du Cu porteurs d'une charge)

B. QUANTITÉ DE Cu DISSOUS TOTAL POUR UNE INHIBITION À 50 p. 100 DE L'ASSIMILATION DU P CHEZ *S. QUADRICAUDA*, EN FONCTION DU pH (valeur déterminée graphiquement d'après la figure 3)

C. LOGARITHME NÉGATIF DE LA TENEUR EN Cu (●) ET Cu^{2+} (○) DISSOUS TOTAUX QUI PROVOQUE UNE INHIBITION À 50 p. 100 DE L'ASSIMILATION DE P EN FONCTION DU pH

- d) taux de croissance;
- e) viabilité en culture;
- f) réaction à différents équilibres en ions principaux; l'addition de produits toxiques peut représenter 80 p. 100 du volume du milieu de culture utilisé pour un essai de toxicité; cela provoque un déplacement radical de l'équilibre cationique-anionique;
- g) différences clonales entre organismes testés appartenant à une même espèce;
- h) état physiologique des organismes;
- i) caractéristiques de la division cellulaire.

Position dans la taxinomie

Venkataraman et Rajyalakshmi (1972) ont montré que la tolérance aux pesticides des cyanobactéries fixatrices d'azote est très variable. Il a été montré qu'*Anabaena* sp. peut être 1000 fois plus tolérante au cérésan que *Nostoc* sp. Toutefois, *Nostoc* sp. est 100 fois plus tolérant à la propazine qu'*Anabaena* sp.

Hollister et Walsh (1973) ont testé la sensibilité aux pesticides des chlorophytes, des bacillariophytes, des chrysophytes ainsi que des rhodophytes; ils ont montré qu'il existe d'importantes variations à l'intérieur des groupes comme entre les groupes. Ces chercheurs ont recommandé le recours à plusieurs espèces représentatives de chaque groupe et l'utilisation de différents groupes pour obtenir des résultats représentatifs sur les effets des herbicides sur les algues. Stratton (1984) a montré qu'*Anabaena inaequalis* est 50 fois plus sensible à l'atrazine qu'*Anabaena variabilis*, mais avec l'atrazine déisopropylée, un produit de la décomposition de l'atrazine, cette espèce ne l'était plus que deux fois. Les comparaisons avec les algues vertes ont également montré des variations considérables de toxicité des pesticides, bien qu'aucune tendance nette ne se soit dégagée.

Lors de la comparaison des effets du fongicide Fennosan F 50 dans différents milieux, Eloranta (1982) a montré que parmi les trois espèces d'algues testées, *Monoraphidium griffithii* est environ dix fois plus sensible à ce produit que *Chlorella kessleri* et que *Selenastrum capricornutum*.

Des études de Walsh (1972, 1983), de Fisher et Wurster (1973) et d'Ibrahim (1983, 1984) figurent parmi les études où la toxicité des pesticides a été évaluée sur plusieurs espèces d'algues. La variabilité observée entre les divisions comme à l'intérieur des divisions est considérable; cependant, il semble que les diatomées sont généralement plus sensibles que les algues vertes. Des travaux de Peterson (1988) dont les résultats n'ont pas été publiés montrent qu'une diatomée s'est révélée 1000 fois plus sensible au cuivre qu'une algue verte.

Bref, plusieurs articles portant sur les différences spécifiques montrent nettement qu'il existe des écarts de toxicité d'un à trois ordres de grandeur, et il semble que les algues vertes sont plus tolérantes que les diatomées. Personne ne s'est arrêté à étudier comment ces différences peuvent être expliquées morphologiquement, comme par le fait d'être des organismes unicellulaires, coloniaux ou filamenteux. Il est probable que les producteurs de mucilage ne peuvent pas être comparés à des organismes produisant peu ou pas de mucilage.

État physiologique de l'organisme

L'état physiologique, ou "santé", d'un organisme recouvre des facteurs comme le taux de croissance ou le type et la nature des carences en éléments nutritifs ou encore la suffisance en éléments nutritifs. La température, l'éclairement et la turbulence peuvent agir sur l'état physiologique et doivent donc être définis.

La croissance dans un milieu non sélectif (complet en éléments nutritifs), dans des conditions optimales, approche "umax", le taux de croissance maximal atteignable par un organisme à une température donnée lorsqu'il n'est pas limité par des facteurs chimiques ou physiques. La plupart des protocoles qui servent aux essais de toxicité précisent qu'il faut une croissance dans un milieu adéquatement pourvu en éléments nutritifs. Le fait d'utiliser comme inoculum des populations d'organismes en croissance logarithmique constitue une façon raisonnable d'obtenir une croissance logarithmique soutenue dans les essais de toxicité. Plus l'essai se prolonge, plus grande est la probabilité de produire des organismes montrant un taux de croissance ralenti dans les témoins.

La croissance de populations d'organismes en Chemostat est réglée par la carence en un élément nutritif donné, par exemple, le N ou le P. Le taux de croissance peut être ajusté à un niveau inférieur à umax, ce qui permet de simuler des carences légères, modérées ou extrêmes. On pense que la plupart des eaux naturelles sont limitées par la teneur en P (Schindler, 1978), bien qu'un nombre important de plans d'eau dans certaines régions soient limités par la teneur en N (Peterson, 1988). Peterson *et al.* (1984) affirment que les évaluations de toxicité avec des algues devraient porter sur les processus qui limitent l'organisme étudié, car c'est lorsqu'une telle fonction est perturbée qu'il est le plus probable d'obtenir les perturbations les plus importantes.

Il faut alors se demander si les protocoles en usage qui font intervenir l'inhibition de la croissance dans des milieux non sélectifs sont adéquats pour protéger ces organismes.

Hall (1986) a fait l'une des démonstrations les plus nettes d'effets de toxicité sur la croissance en milieu sélectif en comparaison de celle en milieu non sélectif: il a

montré que *Chlorella* dans un milieu carencé en phosphore est 1000 fois plus sensible au cuivre que *Chlorella* dans un milieu non sélectif. En outre, Peterson et Healey (1985) ont montré que les différents cycles d'assimilation des éléments nutritifs n'ont pas la même sensibilité au cuivre et au cadmium. Celui de l'assimilation du nitrate s'est révélé beaucoup plus sensible aux métaux toxiques que celui de l'assimilation du phosphate. Les régions où il y a carence permanente d'azote, par exemple, les terres humides des Prairies (nos travaux préliminaires indiquent que la limitation de N est peut-être commune dans ces systèmes), sont peut-être plus sensibles à la pollution par les métaux que les systèmes carencés en P.

5.3.1.4 L'héritage laissé par *Selenastrum*. - Les protocoles en usage prennent *Selenastrum capricornutum* comme indicateur de la toxicité. La personne qui la première a isolé *Selenastrum* retrace les succès de cet organisme avec les essais biologiques dans la préface d'un symposium sur l'utilisation à titre expérimental des cultures d'algues en limnologie (Skulber, 1978).

RAISONS DU CHOIX DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

1913 à 1959	Observé dans les eaux douces oligotrophes à eutrophes sur plusieurs continents.
1959	Isolé en Norvège, et une culture est conservée par clonage à l'Institut norvégien de recherche sur l'eau.
1960 à nos jours	On peut se procurer des cultures gratuitement partout dans le monde et les essais biologiques qui utilisent <i>Selenastrum</i> sont devenus très courants, notamment depuis que cet organisme est devenu l'organisme pour les essais de routine dans la procédure d'essais sur des algues (EPA des É.-U., 1971).

Les avantages liés à l'utilisation de *Selenastrum* sont les suivants:

- a) taux de croissance rapide (plus de deux divisions en 24 heures, Claesson et Forsberg, 1978);
- b) nombre important de collections de cultures qui l'offrent;
- c) importante base de données;
- d) culture facile.

Les inconvénients liés à l'utilisation de *Selenastrum* sont les suivants:

- a) Par sa morphologie, cet organisme se prête mal à des mesures volumétriques précises. L'inhibition des divisions cellulaires, mais non du rendement photosynthétique, est un effet commun des substances toxiques (étudiée par Davies, 1978), et cela peut être montré avec le plus de précision sur des organismes de forme sphérique. Les estimations de la superficie de la paroi cellulaire n'ont peut-être pas la précision de celles

effectuées avec les organismes sphériques. L'exposition initiale à des substances toxiques dépend de la superficie de la paroi cellulaire (Campbell et Stokes, 1985).

b) Cet organisme produit une quantité considérable de mucilage (Dr J. Lukavsky, Académie des sciences de la Tchécoslovaquie, communication personnelle).

c) Il y aurait lieu de cartographier le génome des cultures clonales et de reprendre périodiquement cette opération afin d'éviter l'apparition de sous-clones qui peuvent réagir différemment au stress créé par les substances toxiques. Cette remarque vaut pour toutes les espèces d'algues utilisées; on dispose maintenant de la technologie nécessaire pour procéder sans peine à une évaluation de la dérive génétique dans les clones d'algues, et cette opération devrait se faire périodiquement avec des cultures de référence. Tous les ans, les laboratoires qui font des essais pourraient se procurer un nouveau stock de cultures de sources certifiées.

La plupart des préoccupations mentionnées précédemment ne sont pas réglées par le recours à un organisme unique pour l'évaluation des effets toxiques d'une substance. Les résultats obtenus par les essais de toxicité valent pour la protection de *Selenastrum capricornutum* en culture dans un milieu non sélectif. Les extrapolations à d'autres organismes et à la situation sur le terrain ne peuvent être justifiées dans l'état actuel des connaissances. Ces essais ne sont pas de simples dosages chimiques. Les essais biologiques peuvent se révéler extrêmement utiles pourvu que l'on comprenne la portée de leurs résultats. Faute de quoi, on peut se tromper par un, deux ou trois ordres de grandeur. Le problème lié à toute méthode, c'est que nous nous retrouvons avec des résultats chiffrés; ceux-ci peuvent se révéler parfaitement farfelus et, si c'est le cas, leur accumulation peut constituer un obstacle dans la recherche d'une solution au problème. Le Dr Jérôme Nriagu, du Centre canadien des eaux intérieures, a fait état de préoccupations semblables au sujet des métaux lors de la Rigler Memorial Lecture (Société des limnologues canadiens, réunion annuelle tenue en janvier 1988):

"Les données sur la teneur en métaux de la plupart des réseaux aquatiques du Canada, notamment des Grands Lacs, sont largement artificielles. Souvent, les laboratoires qui s'occupent de la qualité de l'eau n'ont ni l'argent, ni l'expertise, ni les installations pour procéder à de bons échantillonnages et dosages des métaux en faibles concentrations ou encore n'ont pas l'intention de le faire. L'obstacle à la compréhension réelle de la teneur en métaux demeure la production dans un grand nombre de laboratoires de résultats sans signification."

Dans une perspective de réglementation, il est nécessaire d'obtenir des résultats chiffrés; ces résultats ne doivent pas être nécessairement significatifs. Cela facilite l'établissement de protocoles d'essais normalisés et une apparence de légitimité peut être donnée. Nous croyons qu'il s'agit là d'une description valable des essais de toxicité pour les algues présentement utilisés.

5.3.1.5 Comparaison des protocoles d'essais normalisés sur les algues. - On est rendu à la révision finale des lignes directrices de l'EPA des États-Unis (J. Greene, communication personnelle); nos commentaires s'appliquent aux lignes directrices de 1982 (Holst et Ellwanger, 1982). Nos commentaires sur les essais de l'OCDE valent pour les lignes directrices s'appliquant au contrôle des produits chimiques, plus précisément pour les tests d'inhibition de la croissance des algues (1984). Nous avons également examiné le protocole provisoire d'essai (1987) préparé par l'ISO (ISO, 1987). Tous ces essais sont employés depuis un certain temps. Le protocole d'essai de l'ISO a été mis au point après que des essais d'intercalibration aient été faits dans plusieurs États.

Le protocole d'essai de l'American Society for Testing and Materials (ASTM) est un protocole provisoire présenté au sous-comité E-47.01 et préparé à partir des protocoles et méthodes d'essais d'inhibition et de stimulation sublétales de la croissance d'algues vertes unicellulaires (du Groupe consultatif canadien intergouvernemental sur la toxicité aquatique, 1986). Cependant, il est spécifiquement affirmé que le protocole provisoire de l'ASTM ne doit pas être reproduit, diffusé ou cité par qui que ce soit hors le comité de l'ASTM et c'est pourquoi il est impossible de fournir des commentaires ayant trait à ce protocole.

COMPARAISON DES ESSAIS. - Ces essais, fortement apparentés, ne diffèrent souvent que par la terminologie. Ils sont tous basés sur l'ensemencement de cellules en croissance logarithmique dans des milieux inorganiques auxquels l'EDTA, agent de complexation, a été incorporé. La concentration initiale généralement recommandée est de 10 000 cellules en croissance exponentielle par millilitre; il est préférable que le taux de croissance des témoins soit supérieur à 0,9 division par jour pendant les trois premiers jours. L'inhibition de la croissance est mesurée par l'inhibition du taux correspondant ou par une forme ou l'autre de mesure du rendement (p. ex. la biomasse des algues au début du plateau ou la biomasse atteinte après un nombre donné de jours). La CE 50 (concentration efficace d'inhibition à 50 p. 100) et la CSEO (concentration sans effet observé ou concentration la plus élevée ne présentant aucune différence significative avec les témoins) sont généralement déduites des données sur l'inhibition. Les évaluations de la CE 50 peuvent différer par un facteur de 1000 d'un laboratoire à l'autre, même dans le cas de substances chimiques simples (Nyholm, 1985). Le fait que des comparaisons ne soient pas possibles n'est pas inattendu, compte tenu des exemples apportés par Peterson *et al.* (1984); cela est attribuable principalement à un contrôle inadéquat ou différent des facteurs physicochimiques entre les méthodes (Nyholm, 1985). Ainsi, bien que les

méthodes soient largement comparables, le calcul de la biomasse ou du taux de croissance comme objectifs ainsi que l'inexistence d'un contrôle physicochimique de certains paramètres se traduisent par des prévisions finales de la toxicité qui sont trop variables.

Le tableau 4 montre une comparaison des différents essais. Les points de comparaison sont les paramètres évalués et la source d'azote parce qu'ils ont un effet prononcé sur la variabilité. L'inexistence d'un contrôle rigoureux du pH dans tous les protocoles d'essais est un problème qu'il faut régler. Il y a une autre source d'erreur à considérer également: il s'agit de la contamination du milieu attribuable à l'autoclave et peut-être à la stérilisation sur filtre, dans une moindre mesure.

Comme il a été souligné plus haut, les changements introduits par les micro-organismes modifient la toxicité; les principaux problèmes de cette nature avec les protocoles sont les suivants:

- a) la photosynthèse fait augmenter le pH;
- b) l'absorption de NO_3 fait augmenter le pH (ion compensatoire OH^-);
- c) l'absorption de NH_4 fait baisser le pH (ion compensatoire H^+).

La variation du pH a pour effet sur les algues de modifier la charge électrique à la surface des membranes dans les systèmes de transport ionique et dans le plasmalemma, et elle modifie les potentiels de membrane; en eux-mêmes, ces changements peuvent altérer profondément les processus métaboliques, outre le fait qu'il peut y avoir une influence directe du pH sur ces processus (Soeder et Stengel, 1974). Dans les expériences, il faut donc déterminer un pH et minimiser les variations de part et d'autre de cette valeur. Il s'ensuit qu'une variation de pH d'un ou deux ordres de grandeur dans la concentration d'ions hydrogène n'est pas acceptable (soit une différence de pH d'une ou deux unités; l'ISO avait indiqué 1,5 unité dans une version provisoire). Il est difficile de mesurer le rendement aux concentrations en éléments nutritifs incorporés dans les différents milieux sans qu'il y ait un déplacement radical du pH. Il est donc nécessaire de limiter l'apport en éléments nutritifs (N et P) si l'on veut garder la mesure du rendement à l'intérieur d'une plage raisonnable de pH ou encore, il faut ajouter des solutions tampons susceptibles de stabiliser le pH durant la période d'incubation. Lorsque cette solution est retenue, les variables dont il faut tenir compte sont le passage d'une croissance en milieu adéquatement pourvu en éléments nutritifs à une croissance dans un milieu qui ne l'est plus, ce qui entraîne des changements de sensibilité des algues aux substances toxiques; il faut aussi tenir compte de la capacité potentielle de liaison des solutions tampons ajoutées dans le milieu.

Méthode	Espèce recommandée	Mode opératoire	Objectif	Source d'azote
American Public Health Association (APHA), <i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters</i> , 16 ^e édition, 1985, pp. 735-737	Algues d'eau douce: <i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Anabaena flos-aquae</i> <i>Cyclotella</i> <i>Nitzschia</i> <i>Synedra</i> Algues d'eau salée: <i>Dunaliella tertiolecta</i> <i>Thalassiosira pseudonana</i> <i>Skeletonema costatum</i> <i>Monochrysis Lutheri</i>	Fioles et numération	CE 50 déterminée à partir de umax (taux de croissance maximal spécifique à partir des taux quotidiens jusqu'à cinq jours)	Nitrate
Environnement Canada, région du Québec, <i>Technique d'essai sur des algues en micro-plaques</i> , 1986	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Microplaques, numération ou ATP	CE 50 - 4 h CE 50 - 96 h CE 50 - 8 d	Nitrate
Environnement Québec, <i>Méthode détaillée de quantification de la toxicité au moyen de l'algue verte Selenastrum capricornutum</i> , 1983	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Fioles et numération	CI 50 - 8 d	Nitrate
ISO, Norme sur la qualité des eaux, <i>Essai d'inhibition de la croissance des algues</i> , 1987	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Fioles et numération ou absorbance de la lumière	CE 50 - 72 h	Ammoniaque
OCDE, <i>Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques</i> , <i>Essai d'inhibition de la croissance algale</i> , 1984	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Scenedesmus capricornutum</i> <i>Scenedesmus subspicatus</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	Fioles et numération ou absorbance de la lumière	CE 50 ou CSEO (24, 48 ou 72 h)	Ammoniaque
U.S. EPA, <i>Méthode d'essai de croissance algale, Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms</i> , 1985	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Fioles et numération, chlorophylle ou absorbance de la lumière	CSEO - 96 h CPPEO - 96 h	Nitrate
U.S. EPA, Office of Toxic Substances, <i>Guidelines for Testing of Chemicals: Algal Acute Toxicity Test</i> , 1982	<i>Selenastrum capricornutum</i> <i>Skeletonema costatum</i>	Fioles et numération	CE 10 - 96 h CE 50 - 96 h CE 90 - 96 h	Nitrate

CSEO: concentration sans effet observé. CPPEO: concentration avec le plus petit effet observable.

CI 50: concentration inhibitrice 50 p. 100.

Tableau A 73⁹⁰ p. 74

TABLEAU 4 MÉTHODES POUR LA DÉTERMINATION DE L'INHIBITION
DE LA CROISSANCE DES ALGUES

Relu... 75%

Insérer le tableau

Une méthode à la fois meilleure et simplifiée en théorie comme en pratique est de limiter les changements occasionnés par les microorganismes en travaillant avec des algues en faible concentration et en arrêtant les essais avant que les changements ne deviennent importants. C'est ce qui a été fait en partie en réduisant de 96 à 72 heures la durée de l'essai (OCDE, 1984); la possibilité de faire passer la durée à 48 heures est présentement envisagée (Nyholm, communication personnelle). Walsh (1983) est également en faveur des brèves périodes d'incubation; il a proposé que les essais prennent 48 ou 72 heures au lieu de 96 heures ou plus. Cette voie cause certains problèmes: ainsi, la mesure de la biomasse des algues est rendue plus difficile en faible densité cellulaire; en outre, il peut y avoir une question de coût associée à ce problème. Dans sa revue de 1985, Nyholm fait valoir des arguments théoriques et pratiques en faveur du recours à la mesure du taux de croissance plutôt qu'à celle de la biomasse dans les essais de toxicité; il a précisé sa pensée sur la question de façon à donner encore plus de poids à ses arguments (Nyholm, communication personnelle). Toutefois, s'il est mesuré dans des conditions bien contrôlées, le rendement peut apporter des réponses à des questions étrangères à la mesure du taux de croissance. Les variables qu'il faut absolument contrôler sont les éléments nutritifs, les conditions physiques (éclairage), chimiques ou biologiques qui déterminent le rendement ainsi que la variabilité des conditions générales de croissance tout au long des expériences (dérive du pH, exposition à la lumière (auto-ombrage), état physiologique).

Que signifie la mesure du rendement? Chez les populations témoins en l'absence de produits toxiques, les microorganismes passent d'une croissance exponentielle équilibrée à une croissance déséquilibrée où les composantes cellulaires sont synthétisées à des vitesses différentes: la composition cellulaire vient donc à dépendre du facteur de croissance limitant. À supposer que les cellules soient plus vulnérables aux produits toxiques lorsqu'il y a carence d'un élément nutritif (Hall, 1986), la mesure du rendement qui tiendrait compte à la fois de la croissance en phase relativement peu sensible (c'est-à-dire la phase exponentielle) avec éléments nutritifs en suffisance et de la phase plus vulnérable avec carence en certains éléments nutritifs peut donc se révéler plus sensible dans l'ensemble que les mesures de rendement fondées sur un taux de croissance régulier.

Il y a aussi la question de la source d'azote. Le nitrate et l'ammoniaque sont les deux sources les plus communes (le tableau 4 indique quelle source d'azote est utilisée avec les différentes méthodes). La plupart des algues assimilent l'ammoniaque de préférence (Morris, 1974), mais le nitrate est la source la plus commune dans les eaux

naturelles: ce serait peut-être une bonne raison de le choisir. Les effets prononcés, mais opposés, sur le pH de l'assimilation d'ammoniaque plutôt que de nitrate constituent la principale raison de régler ce problème. En outre, le cycle d'assimilation de l'ammoniaque est moins vulnérable aux substances toxiques que celui de l'assimilation du nitrate (Peterson et Healey, 1985).

En résumé, l'emploi de microorganismes en croissance logarithmique pour inoculer des milieux inorganiques et le fait de s'assurer que les cultures témoins ont certaines caractéristiques de croissance constituent une façon économique et raisonnablement efficace de minimiser les variables associées au matériel biologique lorsqu'on vise l'inhibition de la croissance en présence d'éléments nutritifs en volume suffisant. Les changements chimiques induits par la croissance microbienne et les différentes caractéristiques d'assimilation de l'azote par les microorganismes doivent être établis et incorporés dans les protocoles d'essais.

5.3.1.6 Comparaison des protocoles d'essais non uniformisés sur les algues. - Dans l'introduction de la présente section, différents indicateurs de toxicité ont été décrits. Ils ont tous servi à la détermination de l'inhibition de la croissance des algues. Tous ces indicateurs de la biomasse, ATP, chlorophylle *a*, carbone à l'état de particules, azote à l'état de particules, protéines, etc., sont très couramment utilisés comme substituts à la croissance ou à la biomasse. Lorsque la croissance est équilibrée, chacune des composantes biochimiques est directement proportionnelle à la biomasse. Cependant, les substances toxiques vont certainement produire une croissance non équilibrée (effets sur l'absorption du P et du N, Peterson et Healey, 1985; DeFillippis *et al.*, 1981); le rapport cesse alors d'être directement proportionnel. Lorsqu'on utilise des indicateurs de la biomasse, il faut les étalonner. L'avantage des indicateurs de la biomasse en regard des mesures directes de croissance (dénombrement des particules) tient aux possibilités d'automatisation des opérations. Blaise *et al.* (1986 et communication personnelle) ont bien étudié la question. Ils ont comparé des dosages de l'ATP à des mesures de croissance et ont trouvé une bonne corrélation chez *Selenastrum* avec la substance toxique utilisée (Blaise *et al.*, 1986). Ils ont également comparé les techniques sur microplaques aux techniques régulières dans des fioles. Il y avait une bonne corrélation entre les essais même si la sensibilité de la technique sur microplaques s'est avérée inférieure pour l'analyse de certains métaux. Blaise (communication personnelle) a pu réduire le coût des essais en automatisant davantage les opérations. Nous avons des soumissions remises par un laboratoire commercial (prix de 1987) qui fait des essais sur microplaques et dans des fioles; les essais sur

microplaques coûtaient 180 \$ chacun, alors que ceux dans des fioles Erlenmeyer coûtaient 718 \$. Peterson (1988) a trouvé que certaines substances s'avèrent moins toxiques dans les microplaques (ces dernières sont faites de polystyrène) qu'elles ne le sont dans les tubes à essais en borosilicate; cependant, étant donné les considérables économies possibles, peut-être est-il envisageable de sacrifier un peu de précision à des fins d'économie. Les essais dans des erlenmeyers sont coûteux par définition et offrent peu de possibilités d'automatisation des opérations.

La solution de rechange à la mesure de la croissance ou aux indicateurs de croissance est le recours aux processus biochimiques moins complexes pour indiquer la toxicité. Dans ce cas, il n'est peut-être plus nécessaire d'établir une corrélation directe entre le processus considéré et la croissance. Les essais biologiques qui entrent dans cette catégorie sont:

- a) formation-décomposition de l'ATP (Blaise *et al.*, 1986);
- b) changements de fluorescence (Christoffers et Ernst, 1983);
- c) mouvement (Ulrich *et al.*, 1982);
- d) assimilation des éléments nutritifs (Peterson *et al.*, 1984; Peterson et Healey, 1985);
- e) production d'oxygène (Turbak *et al.*, 1986);
- f) inhibition de la photosynthèse (Moody *et al.*, 1981);
- g) changements de pH du milieu (Lusse *et al.*, 1986).

Plusieurs de ces essais biologiques sont excellents pour l'étude de problèmes précis et certains offrent des possibilités considérables d'automatisation. Différents types d'essais pourraient être développés à des fins précises et seraient tout à fait valables pourvu qu'on en connaisse les limites. Il ne semble pas raisonnable pour l'instant d'adjoindre des essais du genre aux protocoles d'essais, mais on pourrait très bien s'en servir pour le dépistage et l'identification des plages de grandeurs. Le cas échéant, il faudrait fournir les comparaisons avec les essais normalisés d'inhibition de la croissance.

5.3.1.7 Solutions possibles pour les essais sur les algues. - Nous avons parlé plus tôt des problèmes liés à l'interprétation des résultats des essais biologiques, et dans cette perspective, nous avons sollicité l'opinion des personnes qui ont répondu au questionnaire. Les réponses à des questions précises sur les algues différaient beaucoup et c'est pourquoi nous avons consulté principalement des spécialistes ayant une expérience pratique et théorique des algues.

Les avantages qu'offrent les algues par rapport aux semences, aux semis ou aux macrophytes aquatiques comportent entre autres:

- a) exposition uniforme aux substances toxiques;
- b) obtention de plusieurs générations à chaque expérience;
- c) petite taille des échantillons;
- d) possibilités d'automatisation;
- e) disponibilité de souches pures conservées dans plusieurs collections de cultures partout au monde;
- f) détermination facile des processus de complexité biochimique différente grâce à des méthodes volumétriques;
- g) tests applicables à des eucaryotes comme à des procaryotes.

L'utilisation d'une seule espèce pour les essais ou même de quelques-unes provenant du même groupe taxinomique diminue considérablement le potentiel des essais biologiques sur les algues. Dans le questionnaire, trois questions portaient sur l'orientation que devraient prendre les essais:

- a) Devrait-il se faire plus de travail sur le terrain? Question 7.
- b) Faudrait-il passer à des études en mésocosme? Question 8.
- c) Faudrait-il développer l'approche des batteries d'essais où seraient testées une série d'algues en monoculture pour choisir les espèces représentatives des communautés les plus sensibles trouvées dans les milieux naturels? Question 9.

La question 9 a suscité des réponses diverses de scientifiques qui ont une expérience pratique ou théorique de l'algologie (sauf indication contraire).

Personne n° 2: "Cela va probablement nous fournir des données plus rigoureuses, mais seul un calibrage en fonction de données écologiques permettra une interprétation en termes d'écologie. Il faut parfois effectuer une évaluation sur le terrain, mais pas très souvent."

Personne n° 3: "Oui. Je crois qu'il est possible d'avoir une batterie d'essais plus importante. Nous avons maintenant le savoir-faire et les connaissances de base pour préparer une série d'essais biologiques à court terme et sur une période plus longue en utilisant des plantes aquatiques vasculaires indigènes du Canada." (Ensemble de plantes vasculaires plutôt qu'avec des algues.)

Personne n° 12: "L'idée paraît intéressante, mais nous comprenons mal en premier lieu comment pourraient être constituées de pareilles batteries d'essais."

Personne n° 14: "Je serais en faveur de batteries d'essais dans la mesure où cela viendrait couronner des essais sur une seule espèce; je crois que les résultats obtenus seraient plus facilement interprétables que ceux obtenus en laboratoire avec des mésocosmes constitués de plusieurs espèces. Cependant, cette approche ne nous apprendrait rien sur les interactions au niveau biotique, mais nous préparerait aux essais sur le terrain. Je vois bien pourquoi on voudrait choisir des espèces sensibles plutôt que des espèces indigènes, mais je crois qu'il faut prévoir des essais avec ces dernières. Les gens se méfient de résultats qui ne sont pas directement applicables dans leur environnement immédiat (la rigueur des lignes directrices japonaises sur l'environnement constitue un

exemple extrême, mais même des différences d'une province à l'autre sont souvent données comme l'une des préoccupations du public).

Personne n° 16: "Je suis en faveur de l'approche des batteries d'essais. Seulement des essais bien définis produisent des résultats généralisables et quantifiables."

Personne n° 17: "Cela dépend du budget, des ressources en personnel et du temps. Ça ne serait peut-être pas une mauvaise idée d'utiliser une espèce sensible et une espèce indigène pour les essais."

Personne n° 18: "L'approche des batteries d'essais est nettement préférable. L'emploi d'espèces communes permet d'obtenir des résultats comparables d'une région à l'autre. Les espèces ayant une particularité ou les espèces indigènes menacées devraient également être considérées."

Personne n° 30: "Une fois encore, bon moyen de dépistage, mais n'enlève pas le besoin d'essais spécifiques sur le terrain." (Chercheur forestier.)

Personne n° 33: "Je crois que c'est la seule approche possible. Ce qui m'embête, c'est comment il faut utiliser les résultats." (Chercheur forestier.)

Personne n° 35: "C'est une très bonne approche. Il suffit de vérifier que les espèces choisies ont des réactions qui correspondent aux espèces trouvées sur le terrain."

Personne n° 38: "Pour obtenir des résultats qui ont une signification écologique, il faut recourir d'abord à une batterie d'essais puis à des essais sur certaines espèces régionales sensibles. Le sol, le climat, la nature de l'eau, le pH, les stress locaux ont tous des répercussions sur le traitement chronique. Il faudrait aussi tenir compte de la variabilité des phénotypes. Cependant, comme il faut être réalistes et que nous ne sommes jamais subventionnés adéquatement, il faut envisager la possibilité de recourir à l'analyse de la teneur résiduelle du sol et à des batteries d'essais généraux avant de passer à des essais plus raffinés permettant de déterminer des différences régionales."

Personne n° 40: "Cela pourrait constituer les premières étapes des essais. Je ne crois pas qu'il serait utile d'insister sur des espèces "sensibles" d'algues. Par exemple, certaines algues bleues fixatrices de N₂ se sont révélées plus sensibles au Cu que d'autres algues, bien qu'on les ait observées dans des milieux perturbés et eutrophes, ce qui ne nous porterait pas à considérer qu'elles sont sensibles. Ce qu'on considère être les espèces d'eau douce les plus sensibles (beaucoup de chrysophytes) sont présentement trop difficiles à obtenir en culture de façon courante, si pas du tout. Comme à la question 4, je crois qu'il vaut mieux mettre l'accent sur le choix d'algues dans plusieurs divisions et de faire des études sur les taux de croissance dans des milieux adéquatement et inadéquatement pourvus en éléments nutritifs. Dans l'étude de Julie Hall, *Chlorella*, la dernière algue à laquelle on penserait si l'on voulait une espèce supposément sensible, était plus sensible de quatre ordres de grandeur au Cu lorsqu'il y avait une carence en P que lorsqu'elle était cultivée dans un milieu bien approvisionné. Je me demande si on peut trouver la même plage de sensibilité en comparant des "plantes de laboratoire" avec les algues planctoniques oligotrophes les plus "sensibles" dans des milieux de culture suffisamment pourvus en éléments nutritifs."

Personne n° 44: "Je suis en faveur de cette approche pour les essais en laboratoire."

Personne n° 49: "Oui, cette approche semble plus significative, mais l'inconvénient, c'est que les espèces ont une sensibilité et un taux de croissance différents. Le fait de cultiver plusieurs espèces dans les mêmes conditions peut causer des problèmes." (Chercheur forestier.)

Personne n° 57: "L'approche de la batterie d'essais revient certainement moins cher. Pour des fins de réglementation, c'est sûrement la voie à suivre."

Les scientifiques qui ont de l'expérience dans le domaine favorisent l'approche de la batterie d'essais pour atteindre à une certaine vraisemblance écologique et améliorer la valeur prédictive des essais de toxicité. Cette approche a également été défendue par Blanck (1984) dans une étude sur les variations de sensibilité des espèces aux produits chimiques. Il a été constaté que la valeur prédictive des batteries d'essais augmente avec leur importance et que la combinaison des organismes d'essai agit également sur la valeur prédictive. Le développement d'une telle approche semble être un objectif atteignable à condition de confier le travail à des physiologistes spécialisés dans la culture du phytoplancton. L'objectif devrait donc consister à assurer ce travail de développement et, ensuite, une normalisation de sorte que les essais de routine puissent être effectués dans tous les laboratoires ayant la compétence requise. Les techniques économiques, par exemple, celles de Blaise *et al.* (1986) devraient être comparées aux méthodes classiques et devraient être considérées dans l'étude de développement. Il faut se souvenir que certaines techniques économiques peuvent requérir l'emploi d'un milieu qui ne convient pas aux essais avec certains organismes; on pense ici aux essais en conditions statiques qui pourraient inhiber la croissance de certains organismes qui ont besoin d'une certaine turbulence pour se développer normalement.

Au cours des dix dernières années, la majorité des efforts a porté sur le développement d'un essai reproductible et réaliste sur le plan chimique. Ce résultat a été essentiellement atteint avec les essais d'inhibition de la croissance pourvu que des précautions soient prises pour éviter la dérive chimique. Les techniques classiques comme les essais en erlenmeyers coûtent cher, et il est nécessaire de pousser le développement l'automatisation comme l'ont fait Blaise *et al.* pour arriver à des solutions économiques. Avec des techniques économiques, il devient également possible d'inclure une série d'organismes plutôt que d'en choisir un seul. Ainsi constituerait-on une meilleure base de références pour le travail sur le terrain et les expériences en mésocosme.

5.3.2 Essais toxicologiques pour les plantes vasculaires. - Il n'y a pas d'expert de la toxicité sur les plantes vasculaires dans notre équipe; c'est pourquoi la section qui suit constitue un résumé de la documentation qu'il a été possible de se procurer et des commentaires reçus des experts dans le domaine.

Dans l'ensemble, il existe peu de documentation sur les essais de toxicité pour les plantes vasculaires qui ne sont pas des espèces visées. La plupart des articles que le dépouillement informatique de la documentation ou que le dépouillement à la main des bibliographies disponibles ont indiqué sont des essais d'efficacité ou des documents justificatifs qui expliquent les décisions prises par l'EPA des États-Unis. Certains des essais d'efficacité présentaient une méthodologie intéressante, et les plantes testées étaient souvent apparentées aux plantes recommandées pour les essais sur les organismes qui ne sont pas visés par les pesticides. Les données des tests d'efficacité peuvent donc se révéler très utiles pour des évaluations dans une perspective de protection du milieu.

5.3.2.1 Choix des espèces. - Les essais avec des espèces vasculaires soulèvent plusieurs problèmes précis. Le choix des espèces constitue l'une des questions les plus épineuses. Les listes d'espèces recommandées par l'EPA des États-Unis (Holst et Ellwanger, 1982) ou par l'OCDE (OCDE, 1984) sont composées d'espèces d'importance économique. On connaît toujours mal le rapport qui existe entre les résultats obtenus avec ces espèces et ceux obtenus avec des espèces qui ont une grande importance fonctionnelle dans le milieu naturel. Nous n'avons trouvé aucun article portant sur cette question. L'approche adoptée dans le *Toxic Substances Control Act* (TSCA, 1982) est peut-être la plus raisonnable: elle permet de substituer des espèces importantes sur le plan écologique à des espèces d'importance économique.

La sensibilité des espèces utilisées pour les essais fait également l'objet de controverses. Certaines autorités insistent sur le fait que l'importance fonctionnelle de l'espèce plutôt que sa sensibilité intrinsèque devrait être le critère gouvernant le choix des espèces (Holst, communication personnelle). Cependant, les experts actifs dans d'autres domaines de l'évaluation de la toxicité préfèrent généralement choisir les espèces qui sont les représentantes les plus sensibles de leur groupe. Par exemple, *Daphnia* est l'organisme de référence pour l'évaluation de la toxicité chez les invertébrés d'eau douce. "Tout le problème consiste à estimer combien d'espèces et quels types d'espèces il faut tester afin de représenter adéquatement l'ensemble de la fourchette des sensibilités, notamment la sensibilité des organismes très vulnérables" (Vouk *et al.*, 1987). Il existe peu de rapports où il est question de la sensibilité comparée des plantes vasculaires; le tableau 5 donne un exemple d'une récente comparaison. Dans ce cas, la fève soja était la plante terrestre la plus sensible; un groupe composé de cinq plantes aquatiques s'est révélé insensible à une substance toxique en très faible concentration et en même temps moins sensible que la fève soja et le coton à cette substance toxique en concentration supérieure (Kenaga, 1987). Nous n'avons pu retracer de comparaison similaire entre espèces

TABLEAU 5 COMPARAISON DES PLAGES DE CONCENTRATIONS LÉTALES DE PRODUITS CHIMIQUES POUR DIVERS ORGANISMES (Kenaga, 1987)

Organisme	Numéro du produit chimique testé	Pourcentage de produits causant 100 % de mortalité dont la concentration se situe entre:	
		0,01 - 0,09 ppm	0,1 - 0,99 ppm
<i>Daphnia magna</i>	33 909	0,6	2,4
Ensemble de 4 espèces de poissons*	35 305	0,14	1,3
Ensemble de 5 espèces de plantes aquatiques*	27 781	0	0,1
Algue (<i>Chlorella</i>)*	49 082	0,006	0,02
Maïs**	37 517	0,008	0,09
Uvulaire à feuilles sessiles**	114 897	0,0017	0,45
Coton**	29 938	0,0067	0,31
Soja**	13 199	0,022	0,79
Radis**	72 649	0	0,017
Ensemble de 5 espèces de plantes terrestres**	131 596	0	0,17
Ensemble de 8 espèces de bactéries et moisissures***	13 409	0	0,2

* Kenaga et Moolenaar (1979).

** Kenaga (1981), germination des semences, juste avant l'émergence.

*** Kenaga et Chambers (1980).

d'importance écologique, par exemple, entre des espèces des prairies ou de l'étage dominé des forêts.

La sensibilité variable des souches ou des cultivars constitue un autre problème qui rejoint le choix des espèces. Les espèces vasculaires peuvent être tout autant variables dans leurs réponses que les algues. La tolérance variable de différents cultivars ou biotypes à l'intérieur d'une même espèce peut résulter de métabolismes différents et/ou de différences dans la vitesse du métabolisme des herbicides; cette tolérance variable pourrait également être d'origine génétique (Hatzios et Penner, 1982).

Plusieurs facteurs agissent sur le métabolisme des herbicides par les plantes appartenant à une variété précise: il y a l'âge de la plante et l'emplacement du mécanisme de détoxification dans un organe donné comme la racine, la pousse ou la feuille (Hatzios et Penner, 1982). Il a été établi que des différences dans l'activité enzymatique qui sont d'origine génétique peuvent résulter en des différences au niveau de la tolérance des cultivars du maïs, de la tomate et de la fève soja aux herbicides. On peut relier des changements observés dans la structure de la membrane des chloroplastes à la tolérance induite chez certaines espèces non économiques comme le chénopode blanc et l'amarante réfléchie (Hatzios et Penner, 1982). C'est pourquoi il est très important de s'assurer que la source des semences d'une variété donnée de plantes est connue, bien documentée et fiable. En outre, pour une interprétation correcte des résultats d'essais avec une souche ou un cultivar donné, il importe de connaître la sensibilité relative des différentes souches d'une même espèce.

Les données sur l'efficacité pourraient servir à déterminer la sensibilité relative des plantes vasculaires. Ces données pourraient également donner une indication des effets à long terme sur le terrain. Par exemple, celles sur les herbicides utilisés pour éliminer les espèces non économiques en forêt peuvent indiquer combien de temps met une de ces espèces à réoccuper la région traitée et indiquer si l'assemblage d'espèces qui suit le traitement ressemble à l'original (Cole, 1976). L'effet de pulvérisations répétées sur des systèmes forestiers pourrait également être évalué grâce aux données sur l'efficacité. Celles sur les herbicides utilisés pour la lutte contre des macrophytes indiquent que beaucoup d'espèces récupèrent rapidement et réoccupent d'une manière explosive un plan d'eau traité, via la reproduction végétative (Crawford, 1981).

L'examen des cas où l'EPA (É.-U.) a exigé pour des produits la tenue d'essais sur des plantes non visées montre que le souci premier est la protection des espèces menacées, et par voie de conséquence, des habitats qui y sont associés. Compte tenu de cela, il semble raisonnable d'exiger le choix des espèces qui s'apparentent le plus aux espèces dont la survie est problématique et qui sont trouvées dans l'habitat menacé. La question est donc de savoir comment obtenir de bonnes cultures fiables et uniformes de ces plantes. Récemment, la seule source de *Lemna gibba* G3 est disparue; cela montre bien à quelles difficultés conduisent les tentatives d'utiliser des plantes indigènes, non cultivées. Alors, un compromis possible serait de recueillir des données sur les réponses comparatives obtenues avec des plantes cultivées et non cultivées, mais qui appartiennent au même groupe (au niveau de la famille, du genre ou de l'espèce si possible).

La réponse d'une espèce ou d'un groupe donné dépend non seulement des caractéristiques physiologiques et fonctionnelles des plantes, mais aussi du produit chimique considéré. Par exemple, le tableau 6 donne la liste des espèces recommandées pour la tenue d'essais biologiques avec différents herbicides (Santelmann, 1977). À remarquer que cette liste est recommandée pour des essais biologiques de détection d'herbicides résiduels et non pour des essais de toxicité. Cependant, il est raisonnable de supposer que ces mêmes espèces pourraient servir aux essais de toxicité.

Craker (1981) a établi une liste de directives pour le choix de plantes indicatrices en vue d'essais de toxicité; les plantes choisies doivent:

- a) être représentatives des espèces trouvées dans le secteur affecté par la substance toxique;
- b) être représentatives de la diversité du règne végétal;
- c) être faciles à se procurer et d'un coût raisonnable;
- d) posséder une croissance et un développement assez rapides;
- e) avoir des besoins limités et non spécifiques pour la croissance et le développement;
- f) être compatibles avec les conditions de croissance des autres plantes indicatrices;
- g) être représentatives des cultures d'importance économique;
- h) être représentatives pour l'identification et la quantification des lésions phytotoxiques;
- i) avoir une susceptibilité connue aux substances phytotoxiques.

Cette liste résume bien les qualités qu'on attend des espèces choisies pour les essais de toxicité.

Craker (1981) a également recommandé quatre espèces indicatrices pour les essais normalisés. Ce sont: le maïs, *Zea mays* var. "butter and sugar"; l'avoine, *Avena sativa* var. "Clintford"; le haricot, *Phaseolus vulgaris* var. "Black Valentine"; le radis, *Raphanus sativus* var. "Scarlet Globe". Il a choisi ces espèces parce qu'elles sont toutes adaptables à la croissance dans un milieu contrôlé, qu'elles représentent les monocotylédones (maïs et avoine) ainsi que les dicotylédones (haricot et radis), et que toutes se prêtent à des essais de rendement, qu'elles ont une importance économique et qu'elles ont déjà servi à des essais de phytotoxicité. En outre, le maïs est un exemple du métabolisme photosynthétique en C-4, et l'avoine, du métabolisme photosynthétique en C-3.

5.3.2.2 Méthodologie. - La méthodologie à utiliser pour les plantes vasculaires, recommandée par l'EPA des États-Unis (Holst et Ellwanger, 1982), est semblable à celle de

TABLEAU 6 ESPÈCES UTILISÉES POUR DES ESSAIS BIOLOGIQUES AVEC
CERTAINS HERBICIDES (Santelmann, 1977)

Herbicide	Espèce
Alachlor (métachlore)	Millet japonais, <i>Chlorella</i>
Amiben	Soja, concombre, avoine, sétaires géante, mauve jaune
Atrazine	Avoine, soja, concombre, <i>Chlorella</i> , sétaires verte, millet japonais, potiron
Bromacile	Potiron, pastèque
CDEC (sulfallate)	Maïs, concombre, avoine, coton
Chlorprophame	Concombre, orge, moutarde, avoine, digitale sanguine
Dalapon	Millet, orge, moutarde, avoine, coton, concombre
Dicamba	Soja, haricot, avoine, sorgho, liseron des haies, concombre
Difénamide	Avoine, orge, ray-grass, tomate, amarante paniculée, chénopode blanc, colza
Diuron	Concombre, ray-grass, orge, <i>Chlorella</i> , avoine, lenticule mineure, potiron
Dinosèbe	Maïs, soja, coton, concombre, pastèque
EPTC	Avoine, millet, sorgho, ray-grass, concombre, potiron
Fluométuron	Avoine, millet, sorgho, ray-grass, concombre, potiron
Linuron	Ray-grass, concombre, betterave à sucre, lenticule mineure, sorgho
Monuron	Digitale sanguine, avoine, soja, orge, moutarde, ray-grass, <i>Chlorella</i>
Paraquat	Lenticule mineure, blé, concombre, haricot, pastèque
Pichlorame	Haricot, concombre, sesbanie, laitue, tournesol
Prométhryne	<i>Chlorella</i> , betterave à sucre, concombre, avoine, blé, potiron, pastèque
Simazine	Avoine, ray-grass, moutarde, soja, lenticule mineure, betterave à sucre
Trifluraline	Liseron des haies, luzerne, mauve jaune, sétaires verte, sorgho, avoine, orge, concombre
2,4-D	Concombre, digitale sanguine, coton, moutarde, lenticule mineure, tomate, sesbanie, soja, <i>Chlorella</i>

l'OCDE (OCDE, 1984). Ces organismes sont les deux seuls à avoir établi des lignes directrices pour des plantes vasculaires; l'EPA est la seule qui ait une ligne directrice pour les macrophytes aquatiques (*Lemna*) (Holst et Ellwanger, 1982). Les paramètres principaux des essais avec les plantes terrestres sont le succès de la germination et la croissance subséquente de dix espèces terrestres choisies dans les monocotylédones et les dicotylédones. La semence est placée sur papier-filtre traité dans des boîtes de Pétri ou dans des récipients remplis de sable quartzeux ou de sol "standard". La toxicité est mesurée par le pourcentage de germination, le pourcentage d'émergence et les indices de vigueur comme la masse ou la longueur. Les effets sur l'émergence sont exprimés en CL 50 et les effets sur la croissance en CE 50. L'EPA fournit également des instructions générales pour la tenue des essais sur le terrain dans des conditions semblables à celles trouvées dans l'habitat naturel.

La germination des semences a communément servi comme indicateur de la toxicité des pesticides parce que la graine en germination constitue un système simple d'évaluation quantitative des effets des pesticides sur les rouages biochimiques du tissu embryonnaire (Agarwal, 1983). Cependant, le mode d'action des différents pesticides varie considérablement. Par exemple, on peut observer l'hypertrophie de l'hypocotylédon ou des cotylédons, la réduction ou la déformation des poils absorbants, l'inhibition des enzymes comme les lipases, l'ATPase, l'amylase, la protéase et la phosphatase, l'inhibition de l'induction par les gibbérélines de la synthèse de l'amylase, des interférences avec l'expression de l'acide indol-acétique, une perte en sucres réducteurs et en acides aminés libres avec une inhibition concomitante de la dégradation de l'amidon ou une inhibition de la synthèse protéinique (Agarwal, 1983). Bien que l'on sache bien que les pesticides ont des effets sur le tissu germinatif, certains auteurs ont rapporté que la germination peut constituer une mesure relativement peu sensible de la phytotoxicité. Par exemple, un essai sur 21 produits chimiques a montré qu'il y avait peu de relation entre la germination et la CSEO (concentration sans effet observé) ou la CE 50 (concentration efficace à 50 p. 100) (Garten et Frank, 1984).

Les incertitudes soulevées par les présentes lignes directrices comprennent notamment la méthode d'application du pesticide, le type de substrat utilisé pour les plantes et les objectifs choisis pour indiquer les effets.

L'EPA des États-Unis recommande l'application foliaire des pesticides (Holst et Ellwanger, 1982); l'OCDE recommande leur incorporation dans le sol (OCDE, 1984). Avec l'application foliaire, on ignore presque entièrement les effets exercés par l'assimilation au niveau des racines (à part une toute petite quantité de pesticide qui pourrait

pénétrer dans le sol ou tout autre substrat pour atteindre le système racinaire des plantes). L'incorporation dans le sol peut conduire à des résultats hautement variables. Santelmann (1977) a observé une variation des résultats lors d'essais biologiques avec incorporation dans le sol exécutés à différents endroits, mais qui étaient apparemment identiques; celui-ci a insisté sur le fait que les conditions du milieu devaient être précisées et respectées avec une grande rigueur. Il a recommandé les conditions suivantes: température de $27 \pm 4^{\circ}\text{C}$; éclairage avec tubes fluorescents à lumière blanche, disposés 46 cm au-dessus du sol; photopériode: 14 h d'éclairage et 6 h d'obscurité; l'application de 0,025 g d'engrais soluble 10-20-10 à la surface de 250 g de sol après la plantation; l'arrosage quotidien à l'eau distillée jusqu'à la capacité au champ qui a été préalablement déterminée. Santelmann a également noté que les essais biologiques dont le mode opératoire consiste à mélanger le pesticide au sol sec avant de procéder à l'humidification du sol ont une plus grande sensibilité. Ni l'OCDE ni l'EPA n'ont atteint ce niveau de précision. Les lignes directrices qui accompagnent le TSCA comportent également des instructions détaillées (voir la section 5.2). Une combinaison ou l'autre de ces deux ensembles de spécifications, avec des modifications appropriées lorsque nécessaire, devrait contribuer à uniformiser les résultats interlaboratoires. La question d'addition d'engrais recommandée par Santelmann (1977) doit faire l'objet d'un examen attentif; la question d'une quantité suffisante ou d'une carence d'éléments nutritifs dans le milieu de croissance affecte autant la réponse des plantes vasculaires aux substances toxiques que celle des algues.

Le type de substrat utilisé fait l'objet d'une certaine controverse (voir la section 5.2). Au coeur du débat est la question de l'effet des interactions pesticide-sol sur la toxicité. Lorsque du sol est utilisé, il faut que le type de sol et que les conditions du milieu soient précisés comme il a été indiqué dans le paragraphe précédent. Le choix d'un substrat inerte ou de sol devrait être expliqué clairement de façon à ce que toutes les hypothèses que ce choix sous-entend soient bien comprises par toutes les personnes qui font les essais. En outre, dans les essais avec les plantes vasculaires, il y aurait lieu de considérer les effets qui résulteraient de la modification de caractéristiques importantes du substrat comme, par exemple, la texture et le pH. Il semblerait raisonnable de recommander d'adopter une gamme de caractéristiques de substrats qui correspondent le plus étroitement possible aux conditions qu'on s'attend à trouver sur le terrain. Par exemple, les essais sur des espèces trouvées dans les sous-étages forestiers devraient prévoir des conditions semblables à celles des sols forestiers, par exemple, un pH plus acide, alors que les essais sur des espèces des prairies devraient prévoir un pH plus alcalin.

et un sol de texture plus fine. Zabkiewicz (1979) a recommandé d'effectuer des essais préliminaires avec des semis en culture hydroponique. Des plantes ont été suspendues à des radeaux flottant sur des solutions contenant des pesticides en dilution. Cette méthode élimine la nécessité de recourir à un substrat.

Les paramètres utilisés pour décrire les effets toxiques après la germination et l'émergence sont habituellement la longueur et la masse végétale fraîche ou sèche. Il est possible également de mesurer la superficie ou la coloration foliaire ainsi que la production de gaz carbonique. Ces mesures sont préférables au dénombrement des plantes ou à celui des plantes mortes. Craker (1981) fournit une liste des symptômes de phytotoxicité qu'on pourrait inclure dans les données sur les effets recueillies lors des essais de toxicité. Il a été observé que la précision des résultats est meilleure lorsque plus d'une méthode d'évaluation est appliquée et qu'on prend les moyennes des résultats pour déterminer la CE 50 (Santelmann, 1977). En outre, l'interprétation des données devrait se faire principalement à partir des tendances obtenues avec un nombre élevé de concentrations plutôt qu'avec quelques-unes seulement (Santelmann, 1977).

Les essais sur la lenticule mineure dont il est question dans la documentation emploient tous la même méthodologie et les mêmes objectifs. On a mis au point des méthodes pour effectuer des essais en conditions dynamiques (Bishop et Perry, 1981; Davis, 1981); cependant, il a été constaté que les essais de remplacement en conditions statiques sont acceptables s'ils sont répétés un nombre suffisant de fois (Davis, 1981). Le nombre de frondes est le paramètre le plus souvent mesuré; il y a aussi la masse fraîche, la superficie et la couleur des frondes (Santelmann, 1977; Lockhart et Blouw, 1979; Lockhart et al., 1983) ainsi que la masse sèche des frondes et la longueur des racines (Bishop et Perry, 1981; Davis, 1981). Davis (1981) a rapporté que les meilleures évaluations étaient la mort des frondes et le dénombrement des frondes; la longueur des racines n'est pas considérée comme un bon paramètre, car il est difficile d'en faire des mesures précises. Autre question soulevée par Lockhart et Blouw (1979), le pH du substrat doit être pris en considération; le pH acide du milieu utilisé dans leur étude serait un facteur dont il faudrait tenir compte avec des composés susceptibles d'une hydrolyse acide. Le sous-comité E-47.01 de l'ASTM sur la toxicologie aquatique est en train de rédiger un protocole d'essai normalisé en conditions statiques pour évaluer la toxicité sur *Lemna*. Une fois approuvé et diffusé, ce protocole constituera une solution de rechange à celui de l'EPA des États-Unis.

5.3.2.3 Autres méthodes. - Santelmann (1977) rapporte une variante de l'essai dans les boîtes de Pétri qui permet d'exposer indépendamment les racines et les pousses de jeunes

semis dans le sol ou le sable traités. Ainsi, du sable siliceux est traité avec un herbicide; les boîtes de Pétri sont remplies à ras bord et la surface du sable lissée. Des semences qui ont commencé à germer et dont les racines apparaissent sont disposées en rangées sur le sable avec l'embryon tourné vers le haut et toutes les racines alignées dans la même direction. Les couvercles sont fixés fermement avec du ruban gommé, et les boîtes sont installées à un angle de 15° de sorte que les racines poursuivent leur croissance le long des couvercles de verre. Les boîtes sont gardées à l'obscurité. Après 16 à 18 h, la position des racines est marquée sur le couvercle. Vingt-quatre heures plus tard, on mesure la croissance au-delà de cette marque. L'allongement des pousses peut être une mesure de l'activité si les semences sont placées plus bas et que les boîtes sont installées de sorte que les pousses tendent à croître le long du couvercle. Une méthode semblable a été appliquée aux essais avec des herbicides volatils.

L'emploi de gélose solidifiée au lieu d'un papier-filtre ou de sol est une autre variante de la méthode de la boîte de Pétri. Des géloses inclinées sont préparées et les semences sont déposées à la surface de la gélose. Les plantules sont récoltées ou mesurées après une période déterminée de croissance (Santelmann, 1977).

On compte parmi les améliorations apportées aux techniques d'allongement des racines l'emploi d'un gerموir vertical conçu de façon à permettre aux racines de se développer en ligne droite, ce qui supprime les problèmes liés à la mesure des racelles croches ou enroulées (Edwards et Ross-Todd, 1980). Le recours à des milieux liquides plutôt qu'à des substrats solides constitue une autre amélioration suggérée; des semis de laitue mis à germer en solution dans des ampoules de niveau en pyrex se sont révélés au moins aussi sensibles à six produits chimiques testés que les semis germés sur papier-filtre (Ratsch et Johndro, 1986).

L'inhibition de la photosynthèse peut être détectée par la méthode du "disque flottant"; avec cette méthode, du tissu des cotylédons de semis ayant dix jours est excisé et mis à flotter à la lumière sur un milieu phosphaté qui contient la substance toxique. Les disques coulent en quelques heures si la photosynthèse est inhibée; autrement, ils continuent de flotter (Truelove *et al.*, 1974). Les auteurs pensent que cette méthode pourrait servir à la sélection des produits chimiques qui ont du potentiel comme herbicide et à la détection de la pollution de l'eau par des inhibiteurs de la photosynthèse.

Les essais de toxicité pour le pollen sont relativement communs dans la documentation; ils peuvent constituer une solution de rechange ou s'ajouter à la liste courante d'essais. Les effets des fongicides sur la germination du pollen ont fait l'objet d'une grande attention. Des méthodes *in vitro* et *in vivo* ont été développées à cette fin.

Avec les méthodes *in vitro*, on utilise communément de la gélose enrichie de sucrose dans laquelle on a incorporé le pesticide. La gélose est étalée sur des lames de microscope ou des boîtes de Pétri en verre et ensemencée avec du pollen frais. Les lames sont incubées aux températures recommandées pour les espèces choisies et le pourcentage de germination est noté au bout de 18 à 24 h (Church et Williams, 1977; Bristow et Windom, 1987). Dans les méthodes *in vivo*, il y a pollinisation des fleurs à la main, suivie de l'application du pesticide par pulvérisation. Les fleurs sont cueillies au bout d'un ou deux jours après la pollinisation et sont conservées. Les styles sont colorés et examinés au microscope à fluorescence. Certaines fleurs ne sont pas coupées de façon à ce qu'on puisse examiner la nouaison du fruit (Church et Williams, 1977). Les essais sur le pollen peuvent se révéler très sensibles à la présence d'un bon nombre de pesticides, d'adjuvants et d'agents tensio-actifs (Shivanna, 1972; Church et Williams, 1977; Bristow et Windom, 1987). Les arbres fruitiers et les arbustes sont parmi les espèces le plus couramment utilisées dans ces essais; on a recours également aux pétunias, au maïs, à l'aubergine, à la coloquinte et au concombre (Gentile et Gallagher, 1972; Gentile et al., 1973; Regupathy et Subramaniam, 1973, 1974; Gentile et al., 1978). Cet essai est raisonnablement simple et rapide et peut constituer une solution de rechange ou encore s'ajouter aux essais existants.

Zilkah et Gressel (1977a, b) et Zilkah et al. (1977) ont évalué le potentiel des cultures de cellules pour tester la phytotoxicité. Onze espèces ont été mises en culture, notamment huit espèces sans valeur commerciale. Les conditions de croissance ont été optimisées pour le rendement. Les auteurs ont noté que les cellules rendues à la phase de croissance exponentielle ont des réactions à certains produits chimiques différentes de celles qu'elles ont lorsqu'elles ont atteint un plateau. Plus l'inoculum est important, plus il faut que le produit chimique soit concentré pour produire une inhibition. La composition hormonale du milieu agit sur l'inhibition produite par certains herbicides du type "auxine". Les auteurs insistent sur le fait que la cinétique de la croissance ainsi que les retards dans la réponse et dans la récupération doivent être considérés lors de l'évaluation de la phytotoxicité; ils insistent également sur le fait qu'il faut des modes opératoires normalisés et un contrôle rigoureux. En comparant la méthode des cultures de cellules à celle de la réponse des semis, les auteurs ont observé que certaines substances affectent beaucoup plus les semis que les cals (notamment les inhibiteurs de la photosynthèse) et que l'inverse est vrai pour d'autres substances. La teneur en pichlorame nécessaire pour atteindre la limite de tolérance de 50 p. 100 (LT 50) chez des cultures de cellules de soja est supérieure par deux ordres de grandeur à celle de la LT 50 des bourgeons de feuilles primaires chez les semis intacts (Davis et al., 1972). L'usage routinier de ces essais pour

des fins de réglementation n'est probablement pas une solution pratique, car ce sont des essais qui exigent une trop grande sophistication, et en outre, les différentes cultures de cellules ne répondent pas uniformément au traitement avec différents produits chimiques.

Il existe une autre procédure rapide et relativement simple qui a été recommandée: c'est la production d'éthane et d'éthylène sous le stress (Simon *et al.*, 1983). Les semences sont déposées dans des tubes à essais contenant de la gélose et une solution de Hoagland; les tubes sont bouchonnés et incubés dans les conditions adaptées à l'espèce testée. Après l'émergence, les pesticides peuvent être appliqués par pulvérisation, au pinceau, à la microseringue ou par trempage. Après l'application du pesticide, chaque tube est scellé et replacé dans la chambre de croissance. Des échantillons du gaz contenu dans les tubes sont prélevés au moyen d'une seringue à différents intervalles et une analyse par chromatographie en phase gazeuse est pratiquée. Le feuillage de chaque plante est également examiné pour voir s'il y a des lésions, et il est pesé après le prélèvement du dernier échantillon de gaz. Les essais ont été complétés en 24 h. Cette méthode peut constituer une solution de rechange raisonnable pour d'autres essais de base du type de la première étape.

On peut appliquer une variante de l'essai sur la lenticule mineure, soit avec des sols contenant des résidus d'un inhibiteur de la photosynthèse (Santelmann, 1977). Dans cette méthode, il faut préparer une bouillie d'eau et de terre qu'on verse dans des récipients en plastique. Les frondes de lenticule sont mises à flotter sur l'eau qui se forme au-dessus de la boue. Les récipients sont ensuite placés sous des tubes à fluorescence pendant 24 h à 20 °C. Ensuite, ils sont transportés avec soin jusqu'à un pulvérisateur de laboratoire où ils sont soumis au traitement; ensuite, ils sont remis à lumière constante pendant 16 à 24 h encore. Les lenticules qui n'ont reçu que le produit chimique auront des lésions. Les frondes dont la photosynthèse a déjà été inhibée par le produit chimique présent dans la boue seront moins endommagées par le produit chimique appliqué. Chacune des frondes est cotée selon les dommages subis, soit la perte de chlorophylle et de l'aspect cireux. Cette méthode peut être utile pour les essais plus élaborés que les essais de base comme, par exemple, ceux en mésocosme ou sur le terrain qui visent à retracer les effets des pesticides après leur migration dans le milieu.

Certaines études portant sur l'effet des produits chimiques sur les macrophytes aquatiques s'accompagnent de mesures raffinées des effets. C'est ainsi que Yoshida *et al.* (1986) ont mesuré l'activité photosynthétique de plantes marquées au ^{14}C . Ces méthodes sont éprouvées et fiables, mais elles nécessitent des installations de laboratoire plus coûteuses que ce qui est requis avec les méthodes couramment recommandées.

Des études ont été faites sur une variété d'autres macrophytes aquatiques, notamment les plantes submergées qui ont un système racinaire. Davis (1980) a fait une étude sur l'élodée (*Elodea canadensis*), le potamot perfolié (*Potamogeton perfoliatus*), le myriophylle blanchissant (*Myriophyllum spicatum*), la vallisnérie américaine (*Vallisneria americana*), *Egeria densa*, la brasénie (*Cabomba caroliniana*) et l'achillée mille-feuille (*Myriophyllum* sp.). Ces plantes ont été recueillies dans leur habitat naturel ou obtenues chez un fournisseur de produits biologiques et cultivées dans des bocaux en verre à 20 °C et avec une période d'éclairement de 12 h sous tubes fluorescents. L'intensité de la lumière et le substrat variaient selon les espèces et selon le substrat naturel dans lequel elles avaient été recueillies. Quatre ou cinq boutures ou tubercules ont été placées dans chaque récipient. Les herbicides ont été ajoutés après que les plantes se soient acclimatées. Ils étaient mélangés à une solution d'un quart de la solution de Hoagland n° 2 avec double teneur en fer. La réaction a été mesurée par la croissance hebdomadaire et la masse sèche à la fin des essais. Les résultats variaient avec l'espèce; l'élodée et la vallisnérie se sont révélées être les deux espèces les plus sensibles. Il a été montré que l'un des herbicides, l'atrazine, est rapidement désorbé des particules d'argile et que cette désorption s'accroît avec le relèvement du pH. Bref, les conditions chimiques et physiques du milieu d'essai étaient d'importance critique. Ce genre d'étude correspond peut-être à la deuxième ou à la troisième étapes. À remarquer que dans la préparation de l'étude, il faut tenir compte de tous les paramètres chimiques et physiques importants qui peuvent agir sur la toxicité; les facteurs "typiques" de l'environnement considéré devraient être incorporés dans l'essai. De plus, il faut tenir compte de la méthode d'application du pesticide, soit dans l'eau ou les sédiments ou sur les feuilles (si c'est une plante émergente) ainsi que de la durée de l'essai.

5.4 Méthodes d'évaluation en microcosme, en mésocosme et sur le terrain

La section qui suit traite de certaines des méthodes utilisées dans les études où les chercheurs tentaient de retracer les effets de produits chimiques dans un système contenant plus d'une espèce, et dans certains cas, plus d'un substrat. Nous avons divisé ces méthodes en trois catégories afin de faciliter l'analyse; cependant, il n'y a pas de définition communément admise des termes "microcosme" et "mésocosme".

Les études en microcosme sont les études effectuées en laboratoire sur plus d'une espèce, en conditions statiques ou dynamiques. Ces études sont également appelées études multi-espèces. Les études en mésocosme sont les études effectuées sur plus d'une espèce dans des cours d'eau ou des étangs artificiels, à l'intérieur ou à l'extérieur, plus

grands que de simples aquariums ou bassins de circulation. Les études sur le terrain sont les études effectuées sur des communautés naturelles dans leur milieu, sans manipulation, exception faite, peut-être, de l'introduction délibérée d'une substance toxique.

5.4.1 Microcosmes. - C'est sur les microcosmes qu'il s'est fait le plus d'études. Ces dernières peuvent être très simples ou porter sur des chaînes alimentaires complexes en conditions dynamiques. Les systèmes les plus simples peuvent être illustrés par une étude sur les successions d'algues soumises au stress produit par un herbicide (Bryfogle et McDiffet, 1979). Dans cette étude, de l'eau autoclavée provenant d'un étang a été versée dans 12 erlenmeyers d'une capacité de trois litres, et elle a étéensemencée avec une communauté d'algues de repiquage établie 60 jours auparavant et stabilisée. Les erlenmeyers ont été placés sur des étagères éclairées par des tubes fluorescents et des ampoules à incandescence pendant 12 h chaque jour, à 21 ± 1 °C. Tous les erlenmeyers étaient aérés grâce à des pierres à barbotage, sauf durant les lectures de pH et de la teneur en oxygène dissous. Le métabolisme des communautés était estimé grâce à des mesures de pH et de teneur en gaz carbonique ainsi que des mesures de l'oxygène dissous. La photosynthèse nette des communautés était mesurée par l'enregistrement des variations de pH durant les 12 h d'éclairement et l'établissement d'une relation entre ces variations et les variations de la teneur en CO₂ de l'eau. La respiration nocturne était mesurée durant les 12 h d'obscurité. La photosynthèse nette de la communauté plus la respiration nocturne donnaient une mesure de la photosynthèse globale de la communauté. De semblables mesures du métabolisme de la communauté ont été faites en surveillant les variations de la teneur en oxygène dissous. Les chercheurs ont également mesuré la teneur en chlorophylle *a*, la biomasse ainsi que la diversité et la dominance des espèces. Il a été observé que la simazine provoque un retard de la productivité nette mais conduit à des pics de productivité plus importants. Le type de succession d'espèces est modifié par le niveau de traitement; *Chlorella* domine aux concentrations supérieures.

Les études en microcosme en conditions dynamiques du milieu sont plus complexes que les études en conditions statiques, comme en font foi celles de Brockway et al. (1984) et d'Hamala et Kollig (1985). Brockway et al. (1984) ont fait des expériences dans des aquariums de verre sans revêtement à 22 °C, avec éclairage de 12 h sous tubes fluorescents à 6500 ± 500 lux. La température de l'eau variait entre 19 °C en période d'obscurité et 24,5 °C en période d'éclairement. Chaque microcosme était constitué d'une couche de 0,5 cm de sédiments provenant d'un étang, de 7 litres d'eau de l'étang et d'un inoculum de plancton tamisé et d'organismes fixés provenant d'un étang naturel. Tous les

microcosmes ont reçu ensuite un inoculum hebdomadaire de plancton tamisé pendant toute la durée de l'expérience, soit 49 semaines. De l'eau de référence standard de Freeman, modifiée, était ajoutée au taux de 0,6 ml/mn. Tous les microcosmes étaient agités continuellement avec des agitateurs en acier inoxydable tournant à 50 t/mn. Les microcosmes avaient 39 semaines pour se stabiliser avant que le produit toxique (l'atrazine) ne soit ajouté. L'oxygène dissous, le pH et les teneurs en phosphore dissous total, en nitrate, en nitrite et en ammoniacque étaient mesurés chaque semaine. L'examen au microscope de la composition spécifique s'est fait pendant toute l'étude. Les résultats montrent une bonne reproductibilité, avec des coefficients de variation le plus souvent inférieurs à 19 p. 100. Les essais en conditions statiques faits en même temps en microcosme avaient des coefficients de variation inférieurs à 7 p. 100. Dans les deux types de microcosmes, il y avait moins d'oxygène produit à mesure que la teneur en atrazine augmentait. Aucun changement important de la dominance des espèces n'a été observé. Les communautés constituant les microcosmes en conditions dynamiques du milieu étaient très résistantes; elles ont récupéré rapidement et complètement après la disparition de l'atrazine.

Le simulateur d'écosystème aquatique (AEcoS) de l'EPA est le système à conditions dynamiques décrit par Hamala et Kollig (1985). L'AEcoS est une chambre à atmosphère contrôlée qui loge un canal en forme de U, de 19,5 m de longueur, de 0,046 m de largeur et de 0,51 m de profondeur. Ce canal est divisé en quatre canaux indépendants, chacun constitué de quatre microcosmes d'une capacité de 4250 litres chacun. En aval de chacun de ces microcosmes, il y a un déversoir placé de façon que l'effluent du microcosme situé en amont devienne la source d'approvisionnement en eau du microcosme suivant. Le canal est fait de plexiglass à revêtement de téflon et le brassage uniforme est assuré avec des roues à aubes dont l'axe est disposé longitudinalement. L'approvisionnement en éléments nutritifs est effectué continuellement par des pompes péristaltiques installées dans le microcosme situé en amont dans chaque canal. Dans cette étude particulière, des communautés périphytoniques ont été établies par inoculation et ensuite par inoculation croisée de chaque microcosme avec des échantillons mixtes prélevés dans les sédiments littoraux de cuvettes locales et des échantillons obtenus au trait. Les microcosmes ont eu 43 jours pour se stabiliser avant que l'atrazine ne soit ajoutée. L'introduction d'atrazine a été interrompue au jour 59, et les microcosmes ont eu 21 jours pour récupérer. La composition spécifique, la numération, la teneur en chlorophylle *a* et la masse sèche moins les cendres ont été obtenus d'échantillons de périphyton. La teneur en oxygène dissous a été mesurée aux heures, et le métabolisme des communautés a été

calculé à partir des variations horaires de la teneur en oxygène dissous, à partir d'une version informatique modifiée de l'équation d'équilibre de masse d'Odum qui s'applique aux conditions dynamiques. Les résultats ont montré une diminution immédiate et continue de la productivité nette, un abaissement significatif de la densité d'algues, une perte de diversité, l'altération de la composition spécifique et l'accumulation ralentie de la biomasse. Il y a eu des différences substantielles dans les taux de récupération des communautés; la productivité nette a rejoint les valeurs témoins en moins de 16 jours, mais les paramètres s'appliquant à la structure des communautés se sont peu améliorés durant les 21 jours d'observation.

À partir de ces systèmes à conditions dynamiques, les protocoles d'essais deviennent de plus en plus complexes. Par exemple, l'AEcoS a servi à l'installation d'un système qui contient des compartiments conçus pour tester des processus précis: photolyse, hydrolyse, système autotrophe, système hétérotrophe, système avec sédiments inorganiques et sédiments de rivière (Holm et al., 1982). Un microcosme terrestre-aquatique utilisé par Metcalf (1975) a permis de modéliser la migration d'un polluant à partir de plants de *Sorghum* enracinés dans une plage de sable ou de terre jusqu'à un "lac" contenant du plancton et plusieurs chaînes alimentaires: *Oedogonium* (algue) à *Physa* (escargot); *Daphnia* à *Culex fatigans* (larve de moustique) à *Gambusia* (poisson). L'eau était aérée et tout le système était contenu dans une chambre à environnement contrôlé, à 26,5 °C avec une période d'éclairement de 12 h à 5000 pieds-chandelles avec tubes fluorescents. La migration des substances toxiques était suivie à l'aide de radiomarqueurs et était exprimée en termes d'amplification écologique (ppm du composé parent dans l'organisme/ppm dans l'eau), d'indices de biodégradabilité (ppm de radioactivité polaire d'un organisme/ppm de radioactivité non polaire et radioactivité de la fraction non extractible). Le microcosme peut être constitué de très nombreuses façons; par exemple, le contaminant peut être appliqué à la surface de *Sorghum* afin de simuler une application foliaire, être appliqué au sol ou aux semences afin de simuler les pesticides à action pré-émergence ou encore dans l'eau afin de simuler la présence de pesticides dans l'eau de ruissellement.

Francis et Metcalf (1981) décrivent une modification du "microcosme terrestre-aquatique" décrit ci-dessus. Le même assemblage d'espèces a été utilisé, mais avec, en plus, dix chenilles de marais salants, *Estigmena acrea*, qui ont été ajoutées afin qu'elles se nourrissent des *Sorghum* traitées. Les chenilles, avec leurs matières excrémentielles, contaminaient la portion "lac" du système. La séquence des traitements est la suivante: du pesticide radiomarké est appliqué sur les plants de *Sorghum* ou sur le sable

au taux de 1 à 5 mg de pesticide par essai, soit l'équivalent d'une teneur vraisemblable de 0,2 à 1,1 kg/ha; les chenilles sont ajoutées; le mouvement des pesticides, des plantes à l'eau, est mesuré grâce à la radioactivité d'échantillons multiples d'eau de 1 ml à intervalles spécifiés; 26 jours après l'introduction du pesticide, 300 larves de moustiques sont ajoutées; trois jours plus tard, 50 larves et 50 *Daphnia* sont prélevées et soumises à des analyses; les chaînes alimentaires sont complétées par l'addition de trois gambusies; l'expérience est interrompue trois jours plus tard; tous les organismes sont pesés, homogénéisés et soumis à des extractions et dosages. Plus de 100 produits chimiques, notamment plus de 80 pesticides, ont été évalués de cette façon. Les résultats ont été comparés aux résultats sur le terrain, et on rapporte que la correspondance est remarquable. Ce système est utilisé de façon courante par l'Institute for Environmental Studies de l'Université de l'Illinois ainsi que pour le Natural History Survey de l'Illinois Institute for Natural Resources.

Plumley et Davis (1980) ont décrit un système qui simule les marées. Ils ont prélevé une tranche de sol de 10 cm d'épaisseur dans un secteur estuarien voisin et placé les échantillons dans des cuves en plastique de 35 cm de diamètre. L'effet des marées a été simulé par le relèvement ou l'abaissement de seaux de 9 litres, contenant 7,6 litres d'eau dont la salinité était ajustée à 20 p. 100 avec de l'Instant Ocean. Les cuves de plastique étaient reliées aux seaux par un tube en caoutchouc. L'eau des seaux était continuellement aérée. Dix crabes appelants ont été ajoutés à chaque système afin d'empêcher que les mattes d'algues bleues ne deviennent la végétation dominante.

Un ensemble détaillé de directives pour l'installation des microcosmes est fourni dans les lignes directrices qui accompagnent le *Toxic Substances Control Act* (TSCA, 1987a, b). Les microcosmes constitués pour les essais sur *Rhizobium*-légumineuses et les tests génériques d'eau douce y sont décrits. Les microcosmes d'eau douce sont divisés en trois types: essais normalisés, essais en récipients avec des inoculums mixtes et dérivés naturellement, enfin, essais en étangs avec des inoculums dérivés naturellement. Les essais normalisés ont recours à une liste stricte d'espèces qui comprend des algues jusqu'à des macro-invertébrés. Les essais en récipients sont faits avec des inoculums provenant de différents écosystèmes naturels repris dans des récipients. Les essais en étangs avec microcosmes sont faits avec une eau, des sédiments et des biotes d'origine introduits dans des aquariums.

Une autre méthode normalisée de travail en microcosme est décrite par Harrass et Taub (1985) ainsi que Taub et Kindig (1986). Le microcosme aquatique normalisé (Standardized Aquatic Microcosm ou SAM) est constitué d'un système composé

d'algues représentant plusieurs groupes taxonomiques (cyanophycées, chlorophycées, bacilliarophycées) et différentes formes (organismes unicellulaires, coloniaux, filamenteux) ainsi que de zooplancton représentant les brouteurs, les détritivores et les omnivores. Les milieux sont définis et l'inoculation de cultures mono-algales et de souches cultivées de zooplancton est spécifiée. Les critères de performance de l'écosystème témoin sont donnés. Les microcosmes sont synthétisés par inoculation de dix espèces d'algues et de cinq espèces d'invertébrés dans un milieu stérile défini chimiquement (milieu T82MV avec un mélange vitaminique afin de favoriser la croissance de *Daphnia*, avec 1/20 des concentrations en chélates et en métaux à l'état de traces et silicate additionnel). Une préparation de 200 g de sable de silicium, de 0,5 g de chitine broyée et de 0,5 g de cellulose est utilisée comme substrat sédimentaire. Les récipients sont des bocaux en verre d'une contenance de quatre litres. Les algues ont quatre jours pour proliférer avant que les invertébrés ne soient ajoutés. Une petite quantité d'algues est rajoutée chaque semaine, et les invertébrés sont réinoculés lorsque leur densité est très basse (moins de trois par bocal). La réinoculation permet de simuler la récupération d'un écosystème et l'immigration ou la constitution de refuges dans des communautés naturelles. Des numérations sont faites deux fois par semaine. Les variations de la teneur en oxygène dissous, du pH et de la fluorescence *in vivo* sont mesurées deux fois par semaine. La teneur en éléments nutritifs dissous, la chlorophylle et l'assimilation nette de carbone sont mesurées deux fois par semaine pendant les 28 premiers jours et chaque semaine par la suite. Les dosages des éléments nutritifs et le biovolume des algues sont également évalués. Les microcosmes sont soumis à un éclaircissement de 78-81 E/s à l'aide de tubes fluorescents, avec une période d'éclaircissement de 12 h. La température est conservée à 20 ± 2 °C. Les traitements chimiques sont appliqués le septième jour.

Une comparaison des microcosmes à conditions statiques et de ceux à conditions dynamiques a révélé que les deux systèmes ne peuvent être régulièrement substitués l'un à l'autre puisque des différences dans leur conception même peuvent conduire à des résultats très différents avec une même substance (Isensee et Yockim, 1980). Il faut tenir compte de la dégradabilité des substances testées lorsqu'on choisit l'une ou l'autre des méthodes. Les substances qui se dégradent lentement et qui persistent dans le milieu devraient avoir un comportement semblable dans les deux systèmes (taux d'accumulation, quantité totale accumulée et effets sur les organismes). Par ailleurs, les substances qui se décomposent rapidement devraient avoir des effets différents. Ainsi, les organismes aquatiques employés pour des essais en conditions statiques seraient exposés à un mélange variable de substances lorsque des pesticides dégradables seraient testés, alors

que les organismes placés dans des systèmes à conditions dynamiques seraient surtout exposés à la substance d'origine. Le mode probable d'introduction dans le milieu constitue un autre facteur important dans le choix du système. Le système à conditions statiques simule l'introduction des produits par érosion ou par les sédiments. Dans ces conditions, les pesticides seraient transportés dans l'eau avec les matières en suspension sur lesquelles ils seraient adsorbés. Les systèmes à conditions dynamiques simulent l'introduction des substances dans un effluent (Isensee et Yockim, 1980). Les études de toxicité chronique et celles sur les effets donnent généralement de meilleurs résultats avec les systèmes à conditions dynamiques parce que cela permet de définir d'une façon plus précise et de mieux contrôler l'identité et la concentration de la substance toxique. Avec des substances peu dégradables et lorsqu'on veut procéder à des essais de toxicité aiguë, les systèmes à conditions statiques pourraient donner d'aussi bons résultats, sinon meilleurs, que les systèmes à conditions dynamiques. À remarquer également qu'il n'est pas pratique d'utiliser un système à conditions dynamiques lorsqu'on dispose d'une quantité limitée d'une substance radiomarkuée.

Il y a moins de descriptions et il est moins souvent question des microcosmes terrestres dans la documentation. Gile et al. (1981) décrivent un microcosme terrestre conçu pour suivre des herbicides dans leurs transformations. Ce dernier était constitué d'une boîte en verre (1,0 sur 0,75 sur 0,06 m) avec un couvercle en plexiglass. Ce récipient était exposé à un éclairage de 2500 pieds-chandelles à la surface du sol, avec une période d'éclairage de 16 h. La température était réglée à 25 °C durant la période d'éclairage et à 15 °C durant la période d'obscurité. Le débit d'air était fixé à 50 l/mn. Le substrat comprenait 40 p. 100 de sable de mer lavé à granulométrie 20, 40 p. 100 d'illite et 20 p. 100 de Jiffy Mix Plus. La végétation incluait une plantule de sapin de Douglas dans chaque quadrant, entourée de plantules d'aulne de l'Oregon et de ray-grass vivace. Les sapins avaient à peu près un an au moment de leur plantation, et les aulnes, deux mois. Les invertébrés étaient représentés par des nématodes bactériophages, des lombrics, des cloportes, des larves du ver de farine, des grillons domestiques et des petits escargots de jardin. Une femelle gravide de campagnol *Microtus canucautus* était le seul vertébré. Un pesticide radiomarkué était introduit 26 jours plus tard par pulvérisation foliaire. Un dénombrement des espèces animales visibles était fait chaque jour, et les animaux morts étaient retirés à mesure qu'ils étaient trouvés. Ce système visait à suivre la migration du pesticide dans les différents éléments de ce système, mais ne visait pas à en déterminer la toxicité. Cependant, avec certaines modifications, c'est un système qui pourrait servir à des essais de toxicité.

Sheehan (1987) propose de compléter les études sur les microcosmes terrestres avec des études lysimétriques, qui se sont révélées efficaces pour l'évaluation de l'effet des polluants atmosphériques sur la dynamique des éléments nutritifs dans des milieux sols-plantes relativement complexes. Des études de la productivité des plantes dans des chambres climatiques sont également proposées.

Dans un compte rendu d'un atelier de travail sur les microcosmes terrestres, Gillett et Witt (1979) résument les principaux types de microcosmes qui ont fait l'objet d'essais, avec leurs avantages et leurs inconvénients et donnent des conseils sur leur conception. Les principales caractéristiques à l'étude sont présentées au tableau 7. Les microcosmes ont pour avantages de permettre la démonstration des interactions, de fournir des indices de la distribution chronologique, spatiale et relative des substances chimiques, de rendre les essais plus économiques et plus pratiques que ceux sur le terrain, de constituer une étape intermédiaire entre les essais avec une seule espèce et les essais sur le terrain, de permettre une évaluation des effets dans des systèmes assez complexes, mais en conditions de laboratoire et enfin, de fournir des renseignements qu'il est impossible de prévoir en laboratoire et qu'il serait décourageant de découvrir à l'étape des essais sur le terrain. Les microcosmes comportent toutefois certaines limites, notamment la durée trop brève des essais pour la mise en évidence d'un certain nombre de processus écologiques; l'absence de certains processus importants, soit parce qu'on ne les connaît pas ou à cause de contraintes matérielles; l'obtention de résultats qui s'appliquent seulement pour des petits systèmes confinés.

Afin de tirer profit des avantages et de minimiser les lacunes des microcosmes, il faut que leur conception et leur application soient fondées sur une analyse soignée des hypothèses de départ, une hypothèse de travail appropriée et des questions (dans la façon d'exécuter les essais) qui tiennent compte des contraintes du système (Gillett et Witt, 1979). Les résultats ainsi obtenus devraient pouvoir se défendre sur le plan scientifique, même si des expériences distinctes comportent certaines variantes. Gillett et Witt parviennent à la conclusion que les microcosmes sont les plus utiles comme solution intermédiaire entre les essais de laboratoire sur des espèces uniques et les essais sur le terrain.

5.4.2 Mésocosmes. - Il n'y a pas autant d'études à grande échelle sur les mésocosmes qu'il n'y en a sur les microcosmes. Une étude souvent citée est celle de F. de Noyelles et al. (1982), dans laquelle six étangs ont été drainés et remplis avec de l'eau d'origine naturelle et du plancton provenant d'un étang adjacent alimenté par l'eau d'un puits, afin

Système						
Caractéristique	Sol-plante ^a	Monoculture terrestre ^b	Micro-agro-écosystème ^c	Chambre pour microcosme terrestre ^d	Carotte de sol ^e	Écosol-litière respi
Volume	1,0 litre	19 litres	863 litres (1,5 sur 0,5 sur 1,15 m)	458 litres (1,5 sur 0,75 sur 0,6 m)	40 cc	500 cc
Masse du sol	0,7 kg	0,4 kg (vermiculite) 3,0 kg (drumner)	165 kg	150 kg	80 g	100 g
Type de sol	Loam limoneux; sableux; sable quartzueux	Vermiculite; loam limono-argileux	Loam sableux	Mélange synthétique pour plantes; loam limono-argileux	Différents types de sols de forêts et de prairies	(Sapin; auline litière)
Température	28 °C/20 °C	26 °C/19 °C	Ambiant ^f	30 °C/19 °C	26 °C/20 °C	19 °C
Éclaircissement/obscurité	12 h/12 h	12 h/12 h	Ambiant	16 h/8 h	12 h/12 h	0 h/2
Débit d'air	Ambiant	Ambiant	2500 l/mn	1050 l/mn	Ambiant	O ₂ sol
Apport d'eau	Addition au poids; percolation	Addition au poids; étude aquatique post-terrestre	"Pluie" pour ajuster l'humidité; excès pour la percolation	"Pluie" pour ajuster l'humidité; "printemps"	Volume fixe sur base hebdomadaire pour la percolation	Aucun
Plantes	Maïs	Maïs; soja	Maïs; coton; tomate; tabac; céréales et graminées	Luzerne ou ray-grass; sapin de Douglas ou auline de l'Oregon ou ray-grass	Types de plantes endémiques (p. ex. plantes de prés à fétuque)	Aucun
Ajout d'invertébrés	Aucun	Chenille, limace, cloporte, lombric	Aucun	Larves de <i>Tenebrio</i> , escargot, cloporte, lombric, criquet, <i>Collembola</i> spp., nématode spp.	Aucun (faune endémique)	Aucun (faune endémique)
Invertébrés	Aucun	Campagnol des prairies	Aucun	Campagnol	Aucun	Aucun
Microbiote	Ambiant	Ambiant	Ambiant	Ambiant	Ambiant	Ambiant
Durée (par essai)	Jusqu'à 200 jours	30 jours terrestre; 27 jours aquatique	60 à 90 jours	60 à 90 jours	6 à 9 semaines (pré-équilibre de 5 à 7 semaines inclus)	60 jours (pré-équilibre de 30 inclus)

^a Lichtenstein et al., 1974.

^b Cole et al., 1976; Cole et Metcalf, 1977.

^c Besl et al., 1976; Nash et Brell, 1977.

^d Gile et Gillett, 1977.

^e Draggon, 1978a; Ausmus et al., 1977.

^f Bond et al., 1975; Lighthart et al., 1977a, b.

^g Serre avec éclaircissement additionnel au besoin.

Telbhan 7 réduite à 55% p. 100

	Monoculture terrestre ^b	Micro-agro- écosystème ^c	Chambre pour microcosme terrestre ^d	Carotte de sol ^e	Écosystème de sol-litière dans respiromètre ^f
lit	19 litres	863 litres (1,5 sur 0,5 sur 1,5 m)	458 litres (1,5 sur 0,75 sur 0,6 m)	40 cc	500 cc
kg	0,4 kg (vermi- culite) 3,0 kg (drummer)	165 kg	150 kg	80 g	100 g
n limoneux; sableux; argileux	Vermiculite; loam limono- argileux	Loam sableux	Mélange synthétique pour plantes; loam limono- argileux	Différents types de sols de forêts et de prairies	(Sapin de Douglas, aulne de l'Oregon, litière)
C/20 °C	26 °C/19 °C	Ambiant ^g	30 °C/19 °C	26 °C/20 °C	19 °C
/l	12 h/12 h	Ambiant	16 h/8 h	12 h/12 h	0 h/24 h
si	Ambiant	2500 l/mn	1050 l/mn	Ambiant	O ₂ sur demande
ition au s: co- on	Addition au poids: étude aquatique post-terrestre	"Pluie" pour ajuster l'humidité; excès pour la percolation	"Pluie" pour ajuster l'humidité; "printemps"	Volume fixe sur base hebdomadaire pour la percolation	Aucun
s	Maïs; soja	Maïs; coton; tomate; tabac; céréales et graminées	Luzerne ou ray-grass; sapin de Douglas ou aulne de l'Oregon ou ray-grass	Types de plantes endémiques (p. ex. plantes de prés à fétuque)	Aucune
un	Chenille, limace, cloporte, lombric	Aucun	Larves de <i>Tenebrio</i> , escargot, cloporte, lombric, criquet, <i>Collembola</i> spp., nématode spp.	Aucun (faune endémique)	Aucun (faune endémique)
	Campagnol des prairies	Aucun	Campagnol	Aucun	Aucun
dia	Ambiant	Ambiant	Ambiant	Ambiant	Ambiant
du'à }	30 jours terrestre; 27 jours aquatique	60 à 90 jours	60 à 90 jours	6 à 9 semaines (pré-équilibrage de 5 à 7 semaines inclus)	60 jours (pré-équilibrage de 30 jours inclus)

.. 1974.
 C et Metcalf, 1977.
 N et Brell, 1977.
 7.
 usmus et al., 1977.
 L' hart et al., 1977a, b.
 on additionnel au besoin.

Tableau 7 révisé 55% p. 100

TABEAU 7 PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES MICROCOSMES
TERRESTRES QUI ONT SERVI À L'ÉTUDE DU DEVENIR ET
DES EFFETS DE SUBSTANCES CHIMIQUES DANS LE MILIEU

Immunisation des poissons

Régime alimentaire

de créer dans la mesure du possible des conditions similaires du milieu juste avant l'addition d'un pesticide (atrazine). Pour compléter la communauté animale, trois espèces de poissons ont été ajoutées dans chaque étang, soit un prédateur, le crapet arlequin, un omnivore benthique, la barbue de rivière, ainsi qu'un omnivore filtreur, l'aloise à gésier.

L'atrazine a été appliquée à deux concentrations, soit 20 g/l et 500 g/l. La première concentration a été choisie afin que soient représentées les concentrations obtenues en aval dans les bassins hydrologiques, alors que la seconde a été choisie parce qu'elle représentait les concentrations observées dans l'eau en contact direct avec les champs traités. On a appliqué 20 g/l d'atrazine à deux étangs, 500 g/l d'atrazine à deux autres étangs, et les deux derniers étangs ont servi de témoins. La surveillance des étangs a été la plus intense pendant la semaine qui a précédé l'addition de l'atrazine et pendant les 63 jours qui l'ont suivie; un échantillonnage mensuel a été effectué jusqu'au jour 136. Les paramètres généraux de la qualité de l'eau ont été contrôlés régulièrement et des échantillons ont été prélevés afin de doser l'atrazine à des intervalles spécifiés. Les assemblages d'espèces de phytoplancton ont fait l'objet de contrôles par numération et identification, alors que la biomasse a été évaluée avec un compteur Coulter. L'assimilation de carbone par le phytoplancton a été mesurée par incubation avec du $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. L'effet immédiat de l'atrazine a été vérifié dans une chambre de croissance en laboratoire; les réponses enregistrées ont été les suivantes: augmentation de la fluorescence après deux minutes et ralentissement de l'assimilation de ^{14}C durant 24 heures d'éclairement continu à une intensité correspondant à celle observée dans les étangs. Les chercheurs ont surveillé les macrophytes, les insectes, les amphibiens et les poissons (biomasse mesurée au début et à la fin de l'essai) ainsi que le zooplancton (numération après trait vertical). La croissance et la reproduction chez une espèce donnée de zooplancton, une cladocère, ont été étudiées dans des enceintes *in situ* faites de cylindres en plexiglass suspendus dans les étangs. Cet essai en mésocosmes a permis de distinguer les effets de l'atrazine sur la photosynthèse, la croissance et la succession du phytoplancton.

Une étude semblable a été faite afin de déterminer les effets sur les communautés aquatiques de l'application d'herbicides pour la lutte contre les macrophytes (Strange, 1976). Des piscines à parois d'acier recouvertes d'un plastique, construites à l'extérieur, ont été remplies d'eau de robinet déchlorée et dans laquelle on a inoculé une plante macrophyte, *Egeria densa*. Après une période d'acclimatation de 17 jours, trois piscines ont été traitées au diquat et à l'endothall et les trois autres ont servi de témoins. Le contrôle de différents paramètres physiques et chimiques s'effectuait deux fois par semaine. Le calcul de la production quotidienne ou la consommation d'oxygène et de gaz carbonique se faisait à l'aide des variations diurnes de la teneur en OD et à l'aide des variations du pH. Les numérations hebdomadaires du phytoplancton et les mesures de la productivité ont servi à calculer un indice de la contribution du phytoplancton au métabolisme de la communauté.

Kosinski (1984) et Kosinski et Merkle (1984) décrivent une étude en mésocosme constitué de 32 cours d'eau artificiels avec recirculation. L'eau s'écoulait dans des goulottes de bois mesurant 2,44 m de longueur et 1,26 m de largeur qui étaient recouvertes de plastique et remplies d'eau de source sur une profondeur de 4 cm. L'eau provenait d'une source (représentative d'un réseau hydrologique non exposé au ruissellement contaminé par des herbicides) et d'une rivière (représentative d'un bassin-versant en région agricole). Des galets et des plaques de verre ont été introduits dans les circuits afin de permettre une colonisation par des algues péiphytiques; des couvercles translucides en fibre de verre servaient à isoler les goulottes des conditions météorologiques ambiantes. Deux fois par semaine, 2 litres d'eau (15 p. 100 du volume) étaient rejetés et remplacés par de l'eau de source qui apportait de nouvelles algues et de nouveaux éléments nutritifs. Les effets de l'application de quatre herbicides différents ont été mesurés par une numération des algues péiphytiques qui colonisaient les lames de verre et par une mesure de la productivité à l'aide de méthodes de dosage de l'oxygène en eau libre. Les essais ont duré de trois à quatre semaines. Le mésocosme a permis aux chercheurs d'étudier les effets chroniques et les effets aigus des pesticides sur la structure de la communauté péiphytique et sur la productivité et d'évaluer le degré de résistance aux herbicides de la flore contenue dans les deux sources d'eau.

Rawn *et al.* (1982) ont utilisé des bassins artificiels temporaires pour leur étude du devenir de la perméthrine dans les systèmes aquatiques. Les bassins mesuraient 5 m sur 3 m et contenaient 2000 litres d'eau qui formait une lame de 30 cm. Le mouvement de la perméthrine marquée au ^{14}C dans l'eau, les sédiments et les plantes aquatiques a été suivi sur une période de deux ans.

Les enceintes aquatiques (dans des lacs ou des étangs naturels) ont été employées avec succès pour l'étude du devenir et des effets des pesticides dans les systèmes aquatiques. La persistance de la perméthrine, de l'atrazine et du méthoxychlore a été étudiée dans de volumineuses enceintes aquatiques (90 à 125 m³) qui avaient été placées dans un lac naturel par Yoo et Solomon (1981). Day *et al.* (1983) ont étudié l'effet de l'atrazine sur les populations d'algues, la teneur en éléments nutritifs et la teneur en oxygène dissous dans de semblables enceintes volumineuses. Solomon *et al.* (1985) ont étudié la dissipation de la perméthrine dans les enceintes aquatiques; Kauskhik *et al.* (1985) ont étudié les répercussions de la perméthrine sur les communautés de zooplancton dans des enceintes. La conception des enceintes utilisées pour les études précitées est tirée de Solomon *et al.* (1980). Il s'agit d'enceintes souples en vinyle qui sont supportées par des bâtis en bois ancrés sur place. Un cadre métallique disposé au fond aide à garder

les parois dans l'axe vertical. Solomon *et al.* (1980) décrivent également un montage pour l'injection et le mélange parfait de pesticides dans les enceintes. Solomon *et al.* (1982) décrivent des sondeurs-échantillonneurs qui rendent possible l'intégration verticale et qui permettent de prélever du phytoplancton et du zooplancton dans les enceintes. Van der Werf *et al.*³ (1987) décrivent un plan d'enceintes solides et transportables qui peuvent être utilisées dans des lacs exposés à des vents. Trois semaines après l'ensemencement, le phytoplancton situé à l'intérieur de ces enceintes se comportait de la même façon que le phytoplancton situé à l'extérieur.

Nous n'avons trouvé aucune étude portant sur des mésocosmes terrestres.

5.4.3 Études sur le terrain. - Il existe relativement peu d'études sur les répercussions des pesticides dans des milieux entièrement naturels, à cause des difficultés inhérentes à ce type d'étude. Les variations naturelles de la structure et du fonctionnement des communautés sont parfois tellement considérables qu'il devient extrêmement difficile de détecter des effets le plus souvent subtils. Les études sur le terrain faites pour examiner les effets des pesticides sur des espèces non visées sont les plus rares de toutes. La plupart des études sur les herbicides appliqués dans des étangs naturels sont des études d'efficacité des pesticides où l'on vise une élimination ou une importante réduction des macrophytes aquatiques.

Walsh *et al.* (1971) décrivent une étude où la chimie de l'eau et la structure d'une communauté de plancton ont été suivies après l'application d'un herbicide, le dichlobénil. La production de la communauté a également été évaluée avec la méthode des bouteilles claires et obscures. Les résidus du produit chimique ont été dosés dans des échantillons de plancton, d'invertébrés et de poissons. Il a été observé qu'à mesure que les macrophytes mouraient, le phytoplancton et le zooplancton proliféraient, présumément à cause de l'abondance des éléments nutritifs libérés par les plantes mortes ou en dépérissement. L'absorption du pesticide variait selon les espèces; ce dernier a été trouvé en quantité assez importante dans le poisson un jour après le traitement. Une espèce de libellule a absorbé cinq fois plus de dichlobénil qu'une autre. Les amphipodes ont accumulé la plus grande quantité de résidus au troisième jour après le traitement plutôt qu'au premier. La communauté dans son ensemble est retournée à son état d'avant le traitement au bout de trois mois.

Klassen et Kadoum (1979) ont étudié la distribution et la rétention d'atrazine et de carbofurane dans des écosystèmes d'étangs d'exploitation piscicole. Ils ont trouvé que l'atrazine était présente à tous les paliers des écosystèmes étudiés (eau, sédiments,

zooplancton, écrevisses, têtards et poissons) peu de temps après l'application. Le carbofurane n'a été observé que dans l'eau et la boue immédiatement après l'application; par la suite, il n'a été observé dans aucun des paliers des écosystèmes. Les effets des deux pesticides n'ont pas été étudiés systématiquement; des observations non formelles des populations de zooplancton et de poissons ont mené à la conclusion qu'il n'y avait pas d'effet apparent. Ce genre d'étude, portant sur le dosage des résidus et non sur les effets, se rencontre plus souvent que les études portant sur les effets même.

Sortkjaer (1984) avance que les communautés de macrophytes aquatiques constituent de bons systèmes pour l'étude des effets des polluants, notamment les pesticides. Cependant, il y a eu seulement quelques tentatives d'utiliser les macrophytes à cette fin; il faut en connaître plus sur les communautés à l'état non pollué avant de pouvoir évaluer avec précision les effets des polluants.

Sheehan (1987) propose la tenue d'études sur le terrain pour évaluer les effets des produits chimiques sur la productivité des plantes terrestres et sur les cycles nutritifs. Aucun exemple spécial de ce type d'étude n'est donné. En comparaison des données accumulées sur les populations de poissons, par exemple, on manque d'études sur les populations végétales (Vouk *et al.*, 1987). Notamment, il n'y a pas assez d'études à long terme sur les communautés végétales terrestres qui seraient accompagnées des mesures des teneurs en polluants.

5.4.4 Évaluation des méthodes de travail en microcosme, en mésocosme et sur le terrain. - Il est très difficile de comparer une étude à une autre du même type parce que les protocoles expérimentaux ainsi que les espèces utilisées ne sont pas uniformes. C'est pourquoi il faudrait des protocoles normalisés qui soient compatibles avec ceux déjà préparés dans le cadre du *Toxic Substances Control Act* si l'on veut que ces études soient intégrées dans un ensemble obligatoire d'essais.

Dans le questionnaire destiné aux experts en phytotoxicité, plusieurs questions portaient sur l'application d'études en mésocosme et sur le terrain. Ainsi, nous avons demandé si les études sur le terrain peuvent être reproduites et si elles doivent être intégrées dans un cadre législatif, si les études en mésocosme doivent être intégrées dans les ensembles d'essais, quelle est l'importance des essais sur le terrain et enfin, si les essais sur le terrain sont situés à une étape trop avancée dans les présents protocoles (c'est-à-dire, à l'étape 3 ou au niveau définitif).

Une nette majorité des personnes interrogées croit que les essais sur le terrain ont ou pourraient avoir une reproductibilité suffisante pour servir dans un cadre législatif. Ils insistent sur la nécessité d'une conception appropriée des essais. Dans le cas des études terrestres, ce serait notamment une conception par module d'expérimentation avec une bonne reproductibilité, l'inclusion de données saisonnières et annuelles et le choix avisé de matériel végétal pour la tenue des essais (multiplication végétative à partir des mêmes clones ou de la même source de semences, élagage pour uniformiser l'aspect, etc.). En outre, il faudrait tenir compte des caractéristiques de l'emplacement où les études seraient faites (topographie, sol, climat, etc.), et il faudrait en tenir compte dans l'analyse des résultats. Plusieurs personnes interrogées qui travaillent avec des systèmes aquatiques préfèrent l'utilisation d'enceintes de façon à garder un contrôle de l'expérience. La question même de la possibilité de reproduire les résultats est mise en doute par certains. Ils sont d'avis que cela va même jusqu'à fausser le débat; la variabilité même dans les résultats peut constituer un facteur important et apporter une information utile sur les réponses des écosystèmes aux pesticides. Une personne pense que les essais sur le terrain devraient être obligatoires seulement dans le cas de certaines substances. Une autre pense que ces essais pourraient servir à indiquer quels essais de laboratoire sont nécessaires (le contraire de ce qui se fait maintenant). Seulement trois personnes pensent qu'il n'est pas possible d'inclure les essais sur le terrain dans une réglementation. L'un d'eux a spécifié que les études sur le terrain devraient servir à des fins de recherche seulement; les résultats de cette recherche pourraient être appliqués aux choix d'essais avec espèces uniques.

Sur la question des mésocosmes (dont la définition même cause des problèmes), les opinions sont partagées. Certains pensent que les mésocosmes peuvent être utiles dans la mesure où on travaille sur place, mais que ceux reconstitués en laboratoire conduisent à l'apparition d'une foule de problèmes associés à des effets artificiels. Les enceintes aquatiques sont incluses dans les mésocosmes. Le recours à la formule des enceintes permet la reproduction des essais et la constitution de témoins dans un même plan d'eau, ce qui permet d'éliminer les variations qui apparaissent lorsque les études portent sur deux ou plusieurs étangs ou lacs. La mesure des réponses est souvent simplifiée et les variations d'un échantillon à l'autre sont réduites lorsqu'on emploie des enceintes aquatiques. Cependant, ces dernières ont certaines caractéristiques: elles sont d'un volume restreint, contiennent moins d'organismes que le milieu ambiant, ont un brassage moins efficace et ont un rapport de la surface au volume supérieur à celui du plan d'eau dans lequel elles se trouvent (Solomon et al., 1980). Il faut tenir compte de ces limites dans l'interprétation

des résultats. Les expériences en mésocosme sont généralement considérées comme de bonnes techniques de sélection qu'il faut faire suivre d'essais sur le terrain. L'espace requis est un problème particulier des mésocosmes terrestres; dans nombre de cas, les études seraient irréalisables à toutes fins pratiques. Une personne interrogée affirme que des études obligatoires en mésocosme sur des systèmes forestiers conduiraient au chaos réglementaire.

L'inclusion des essais faits sur le terrain dans les protocoles de réglementation a virtuellement fait l'unanimité. La plupart des personnes interrogées affirment que la tenue de ces essais est "très importante", "critique" ou "vitale". Les raisons données pour leur tenue sont notamment la nécessité de tenir compte du climat canadien rigoureux, la probabilité d'effets secondaires et résiduels, la variabilité des effets observés dans l'habitat, la sensibilité différente aux substances toxiques qui est observée entre les essais en laboratoire et les essais sur le terrain et, enfin, le fait que les résultats obtenus sur le terrain peuvent être l'inverse de ceux obtenus en laboratoire. Certains pensent que ces tests devraient être requis pour un nombre limité de substances, notamment celles dont l'efficacité dans le milieu est importante. Un seul attache peu d'importance aux essais sur le terrain; il est d'avis que ceux-ci n'ont généralement pas d'importance en milieu forestier.

Les avis sont partagés quant à savoir si les essais sur le terrain viennent trop tard dans la série d'essais prévus par la réglementation (EPA, OCDE). Certains pensent qu'ils doivent être incorporés tôt au début de la deuxième étape. D'autres pensent que les essais doivent être faits en parallèle. D'autres encore pensent que des essais sur le terrain faits dans une première étape seraient prématurés, du gaspillage et du travail à l'aveuglette. Les personnes interrogées semblent considérer qu'il est approprié de tenir certains essais préliminaires afin de voir quels essais sur le terrain sont requis.

En résumé, les réponses au questionnaire montrent un appui général à l'inclusion d'essais sur le terrain dans les protocoles associés à la réglementation. Les personnes interrogées insistent sur l'importance d'avoir des études bien conçues et doutent de l'utilité de certaines études en mésocosme.

La question centrale soulevée par les personnes interrogées, par les auteurs qui se sont penchés sur la question et par les législateurs est la suivante: "Ces essais contribuent-ils d'une façon importante à notre compréhension des effets des pesticides dans le milieu?" Dans la documentation où il en est question, il semble que ces essais apportent un complément de renseignements utiles qui ne peuvent pas être obtenus à partir des essais sur des espèces uniques. Cela vaut particulièrement pour les

transformations des structures, de la productivité et des successions des communautés. Le défi est de relier de façon la plus efficace possible ces études et celles faites en laboratoire sur des espèces uniques. En d'autres mots, nous avons à décider quelles sont les questions les plus importantes dans la perspective des effets à long terme sur le milieu. Comme il a été montré dans certaines études, les pesticides peuvent avoir des effets transitoires très brefs; il s'ensuit que les essais doivent permettre de distinguer entre les paramètres écologiques susceptibles d'un rétablissement et ceux qui risquent d'être modifiés de façon irréversible. Par exemple, importe-t-il que la productivité primaire soit abaissée pendant deux à quatre semaines après l'application d'un herbicide? Ce déclin réversible conduit-il à des effets secondaires irréversibles sur les herbivores et les carnivores situés plus haut dans la chaîne alimentaire? Les résidus du pesticide persistent-ils dans les biotes et, dans l'affirmative, quelles sont les conséquences?

Les essais passés en revue ici peuvent permettre de trouver la réponse à certaines des questions soulevées plus haut. Cependant, ils sont complexes et nécessitent un important investissement en termes de main-d'oeuvre, de temps et d'argent. Il faudra que la décision d'exiger la tenue de ces essais soit fondée sur des résultats solidement établis par des essais sur des espèces uniques et des essais sur le devenir d'un produit dans le milieu ou encore sur une bonne compréhension de la toxicité des produits dans le milieu qui serait tirée de l'expérience dans l'évaluation des risques écologiques. Les rapports quantitatifs entre les structures et l'activité peuvent concourir également à l'identification des substances chimiques susceptibles d'avoir des effets généraux, sur une grande échelle, sur différents organismes (Vouk *et al.*, 1987). Il sera question plus loin des problèmes théoriques associés aux essais en laboratoire par comparaison aux essais sur le terrain et aux évaluations des risques.

Plusieurs chercheurs ont fait paraître des études comparant les résultats d'essais portant sur des espèces uniques, d'essais en microcosme, d'essais en mésocosme et d'essais sur le terrain. Plumley et Davis (1980) ont trouvé que les essais sur des espèces uniques et en mésocosme se comparent bien; les essais en laboratoire montrent un abaissement de la teneur en chlorophylle, du nombre de cellules et de la productivité chez deux espèces très importantes de diatomées exposées à un herbicide; à la même concentration de la substance chimique, les essais en mésocosme montrent les mêmes effets dans l'ensemble de la communauté. Cependant, les résultats des essais sur le terrain n'indiquent pas de réduction du nombre des microorganismes à la même concentration de la substance chimique, même s'il y a ralentissement de la fixation du carbone. Les auteurs parviennent à la conclusion que les mésocosmes constituent un instrument utile d'évalua-

tion des effets de la pollution. Ils n'ont pas expliqué les différences observées entre les études en mésocosme et les études sur le terrain, ni insisté sur ce point.

Tagatz et Ivey (1981) ont comparé les effets d'un insecticide sur des communautés benthiques observés en laboratoire et sur le terrain. Ils ont trouvé que les résultats des deux études confirment les effets toxiques, et que certains résultats sont caractéristiques de chaque étude. Par exemple, une espèce très sensible sur le terrain n'a pas été trouvée dans les communautés établies en laboratoire. Cependant, les espèces les plus abondantes étaient habituellement observées dans les deux études. Les études confirment les risques prévus par les essais de toxicité aiguë sur des espèces uniques.

Harrass et Taub (1985) ont observé que leurs microcosmes aquatiques normalisés manifestaient les mêmes réponses au cuivre, au niveau de la communauté, que ceux observés dans les études sur le terrain, même si les études sur le terrain montraient une plus grande variabilité dans les réponses. Parmi ces dernières, la dominance des espèces d'algues et la productivité avaient été modifiées.

MM. deNoyelles et Kettle (1985) se sont penchés sur l'utilisation d'étangs expérimentaux pour évaluer les prévisions obtenues grâce à des essais biologiques. Ils ont trouvé que l'addition d'atrazine dans les étangs conduisait aux mêmes diminutions de l'assimilation du carbone par les algues; cependant, l'apparition rapide d'espèces résistantes dans les étangs ne pouvait pas être prévue par les essais biologiques faits à court terme. Des essais biologiques de longue durée, avec un appareillage à circulation continue, ont permis de prévoir la même série de réponses que celle observée dans les étangs.

Giddings et Franco (1985) se sont penchés sur l'étalonnage des essais biologiques en laboratoire à l'aide de résultats obtenus en microcosmes et dans des étangs. Un contaminant organique était ajouté de manière continue dans les étangs et les microcosmes à des concentrations qui permettaient de couvrir la plage de toxicité aiguë et de toxicité chronique déterminée par les essais biologiques sur des espèces uniques. Les effets étaient semblables dans les microcosmes et les étangs, ce qui pouvait signifier que les microcosmes sont des modèles acceptables pour des études sur le terrain dans certaines circonstances. Des changements significatifs du métabolisme au niveau des communautés et des variations des populations zooplanctoniques ont été observés dans les microcosmes et dans les étangs exposés aux substances à des concentrations voisines de la plus faible concentration ayant un effet observé chez *Daphnia magna*. Des effets indirects ont été observés à toutes les concentrations de traitement; cela comprenait le remplacement de taxons sensibles par des compétiteurs plus tolérants qu'eux et des variations dans l'abondance de certaines espèces par suite de l'accroissement démographique de leurs

compétiteurs ou de brouteurs. La concentration d'exposition sans danger déterminée par les expériences sur des écosystèmes a été prévue avec justesse par l'application d'un facteur de 0,03 aux résultats des essais biologiques exacts les plus sensibles (CL 50 - 48 h chez *D. magna*).

Boyle *et al.* (1985) ont comparé les effets du fluorène en laboratoire à ceux sur le terrain. La comparaison des résultats d'essais de toxicité en laboratoire sur des algues et des invertébrés avec les résultats d'études faites dans des étangs a révélé que ces organismes sont plus sensibles au fluorène en laboratoire que sur le terrain. Cependant, les deux espèces de poissons testées se sont révélées plus sensibles sur le terrain. Dans un article de fond où il était fait état de la recherche nécessaire pour déterminer et valider dans quelle mesure les données de laboratoire peuvent être applicables sur le terrain, Boyle a insisté sur le fait que des organismes comme les algues peuvent être très sensibles en laboratoire; cependant, la réaction de la communauté planctonique peut être moins prononcée et plus brève à cause de la sensibilité différente, de la faculté de récupération et de l'adaptabilité des différentes espèces (Boyle, 1985). Par ailleurs, les poissons ayant une grande sensibilité et une mauvaise fécondité risquent d'être affectés pendant longtemps.

Borthwick *et al.* (1985) ont confirmé sur le terrain une évaluation des risques faite à partir de travaux en laboratoire sur la toxicité aiguë d'un insecticide, le fenthion, pour la crevette rose. Des observations sur le terrain ont permis de confirmer la concentration sans effet observé qui avait été déterminée en laboratoire.

Adams *et al.* (1983) ont montré qu'il existe une bonne correspondance entre des données de toxicité aiguë et celles de toxicité chronique obtenues en laboratoire et sur le terrain; le produit utilisé était un ester phosphaté commercial. Les organismes servant aux tests étaient *Daphnia magna* et des têtes-de-boule.

Francis et Metcalf (1981) donnent des exemples de prévision de conséquences écologiques de l'utilisation des pesticides sur le terrain à l'aide de leur microcosme terrestre-aquatique. Ce dernier a permis de prévoir la toxicité élevée pour les poissons et le fort potentiel de bio-accumulation de l'endrine, la présence de l'époxyde de chlordène, qui est un produit persistant de décomposition de l'heptachlore et du chlordane et qui a le potentiel d'être bio-accumulé, le potentiel élevé de migration de l'aldicarbe dans l'eau souterraine et, enfin, la bio-accumulation d'un métabolite du pentachlorophénol.

Neuhold (1986) a examiné l'utilité des essais de toxicité sur des espèces uniques, celle des essais de toxicité sur des microcosmes et celle des études des écosystèmes sur le terrain pour la détermination de l'effet d'une substance toxique sur un

écosystème. Ses conclusions sont les suivantes: malgré leurs limites, les essais en laboratoire sont nécessaires à la compréhension autécologique des réactions des organismes; les essais en microcosme constituent une première approximation de la façon dont un écosystème pourrait réagir à une substance toxique; enfin, les études sur le terrain à l'échelle des écosystèmes sont nécessaires à l'interprétation des résultats de laboratoire et des essais en microcosme, compte tenu de la situation sur le terrain.

Kosinski (1984) a analysé les problèmes théoriques et pratiques associés à l'étude de la composition des communautés comme mesure des effets toxiques. En premier lieu, les communautés naturelles peuvent être composées de plusieurs centaines d'espèces d'algues, souvent rares et observées si peu fréquemment qu'il est impossible de réunir des renseignements fiables sur leur densité et leur dynamique. Même l'espèce dominante conduit à la création d'un ensemble complexe de données qui correspondent à un nombre déroutant de variables comportementales possibles. En outre, sauf dans les cas d'extrême toxicité, il y a tellement de variations d'une station à l'autre et même entre des microsites contigus qu'il est difficile d'isoler les effets des polluants. Kosinski a tenté de régler ces problèmes en travaillant avec des mésocosmes qu'il a reproduits en série. Il a eu de bons résultats; la variabilité entre les mésocosmes était habituellement beaucoup plus grande que l'erreur d'échantillonnage. En outre, ce chercheur n'a pas tenu compte dans son analyse des espèces mineures qui auraient eu pour seul effet d'accroître la complexité de la base de données sans apporter de données fiables. Kosinski insiste sur le fait suivant: "une dimension inévitable des données sur la composition des espèces est qu'il se produit toujours des changements, même quand il n'y a aucun traitement; en outre, le nombre important d'essais de signification rendra problématiques les erreurs du type I. Par conséquent, les effets importants qui sont observés ne doivent être attribués à des traitements que lorsqu'on peut reproduire les résultats ou fournir une explication logique".

Kosinski s'est également intéressé aux espèces indicatrices. Il a montré que certaines espèces ne pouvaient pas servir d'indicateurs fiables de la pollution comme, par exemple, les espèces qui dominent d'une façon prévisible en présence de certains polluants. Cependant, il y a plusieurs espèces susceptibles de disparaître lorsque soumises au stress de la pollution.

Enfin, ce chercheur a analysé l'extrapolation de ses résultats à la situation sur le terrain. Il met le lecteur en garde contre le fait que l'exposition sur le terrain est probablement beaucoup plus transitoire qu'en laboratoire et qu'il est davantage probable que les substances chimiques soient présentes sous une forme moins accessible. Cependant, il a assez confiance en ses données pour dire que le ruissellement des herbicides ne serait nocif pour les algues benthiques que localement.

Sheehan (1987) a passé en revue l'utilisation des mécanismes fonctionnels dans les écosystèmes comme moyens d'évaluation des effets obtenus par des mélanges de substances chimiques. Son travail vaut également pour l'évaluation des pesticides. Ce chercheur dit que "parce qu'un écosystème est un système intégré ayant des caractéristiques fondamentales dont le tout dépasse la somme des parties, les analyses faites à l'échelle des écosystèmes doivent non seulement montrer la réaction des populations de cet écosystème, mais doivent également donner une évaluation globale de l'écosystème pris dans son ensemble". Le choix des fonctions prises comme variables en vue d'une évaluation d'un écosystème dépend de ce dernier. Il varie selon l'importance relative des sources d'énergie, photosynthétique ou allochthone, et des maillons critiques des chaînes alimentaires et ainsi que des cycles d'éléments nutritifs. Par exemple, les variables qui caractérisent le métabolisme d'une communauté (productivité, rapport production-respiration) se révèlent plus sensibles au stress chimique, lors des essais en microcosme aquatique (CV d'environ 10 à 20 p. 100), que les mesures des cycles des éléments nutritifs et de la rétention des éléments essentiels (CV 10 à 100 p. 100). Par ailleurs, la disponibilité et l'absorption des éléments nutritifs constituent des mesures plus efficaces avec les systèmes terrestres. Le tableau 8 résume l'évaluation que Sheehan a faite de l'utilité de différentes variables fonctionnelles pour la détection des effets chimiques. Dans son évaluation de la sensibilité des mécanismes fonctionnels, Boyle (1985) a considéré le type de cycle vital et la sensibilité relative des mécanismes dans les essais effectués en laboratoire. Il a insisté également sur la nécessité de considérer la taille et l'état trophique des écosystèmes, la chimie de l'eau, la complexité et l'organisation des communautés ainsi que la possibilité d'une recolonisation par les espèces.

Sheehan insiste sur l'utilité de combiner les essais de toxicité en laboratoire et *in situ* avec les résultats des relevés sur le terrain.

Étant donné la complexité des données sur le terrain et en mésocosme, il faut appliquer des techniques de réduction des données afin de faciliter l'interprétation. Ainsi, on peut appliquer des analyses à plusieurs variables et des analyses discriminantes afin d'abaisser le nombre de dimensions dans les ensembles de données et d'indiquer les facteurs associés aux variations les plus importantes à l'intérieur des ensembles de données. Ces techniques sont des instruments puissants, mais ne parlent pas d'elles-mêmes. La qualité originale des données est de toute première importance; c'est-à-dire que les données doivent être recueillies avec soin en respectant un plan bien conçu d'échantillonnage (Sheehan, 1987; Green, 1979).

TABLEAU 8 UTILITÉ DES VARIABLES FONCTIONNELLES POUR LA DÉTECTION DES EFFETS NOCIFS IMPORTANTS DE SUBSTANCES CHIMIQUES DANS LES MODÈLES D'ÉCOSYSTÈMES EN LABORATOIRE

Variable de l'écosystème	Modèle lotique	Modèle lentique	Modèle avec plantes terrestres et sol
Production primaire	B	B	M
Production de la communauté	B	B	P
Respiration de la communauté	B	B	B
P/R	B	B	M
Production secondaire	M	M	P
Décomposition	M	M	B
Lessivage des éléments nutritifs	P	P	B
Disponibilité des éléments nutritifs	P	M*	B
Absorption des éléments nutritifs	M ⁺	M	M
Fixation de l'azote	P	B	B
Ammonification	P	M*	M
Nitrification	P	M*	M
Diversité des groupes fonctionnels	B	?	?

Tiré de Sheehan (1987).

B: bonne, sensible et étudiée assez fréquemment.

P: pauvre, insensible, fonctions non importantes ou problèmes de mesure.

M: moyenne, résultats non concluants, mais utilité suggérée par les données sur le terrain.

?: inconnue.

*: dans les modèles de sédiments et d'eau.

+: vortex qui entraîne les éléments nutritifs dans les modèles à circulation.

En résumé, il existe des techniques d'évaluation des effets des pesticides sur les populations végétales et les communautés, tant en microcosme en laboratoire qu'en microcosme sur le terrain, même si la plupart des méthodes sont conçues pour des

écosystèmes aquatiques. Ces techniques correspondent généralement bien avec les effets prévus sur le terrain à partir des essais biologiques en laboratoire. En outre, elles indiquent souvent des effets qui n'apparaissent pas en laboratoire. Ces techniques n'ont pas été normalisées et prennent généralement beaucoup plus de temps et sont plus coûteuses et plus complexes que les essais faits à partir d'espèces uniques. Néanmoins, à cause de l'importance qu'il y a de comprendre les effets des pesticides sur les communautés dans leur ensemble, et non seulement sur une seule espèce, nous arrivons à la conclusion qu'il est justifié de tenter de développer des études en microcosme et en mésocosme terrestres ainsi que des études sur le terrain.

La revue de la documentation faite pour cette étude ainsi que le questionnaire adressé aux experts en phytotoxicité ont mis en relief plusieurs lacunes importantes dans nos connaissances des effets des pesticides et dans la façon de mesurer ces effets. Ce sont:

a) les effets de mélanges de pesticides, particulièrement de mélanges dans des réservoirs (il peut s'agir de mélanges de différents pesticides ou de l'addition d'agents tensio-actifs, d'agents de mouillage, etc. à un pesticide pour former un produit destiné à une fin particulière; l'expression "mélanges dans des réservoirs" ne correspond ici qu'au premier type seulement);

b) les effets des produits de dégradation et, dans une moindre mesure, les effets des agents tensio-actifs, des adjuvants et d'autres agents ajoutés à la préparation commerciale d'un pesticide;

c) les méthodes d'essais en microcosme et en mésocosme terrestres et sur le terrain;

d) les méthodes d'essais normalisées en mésocosme aquatique et sur le terrain;

e) les méthodes d'extrapolation des effets sur le terrain (évaluation des risques) à partir des résultats d'essais normalisés et de dosages de produits résiduels.

6.1 Effets de mélanges de pesticides

Récemment, le Comité scientifique chargé des problèmes de l'environnement (SCOPE) a fait paraître un ouvrage portant sur les méthodes d'évaluation des effets de mélanges de produits chimiques (Vouk et al., 1987). Ce document est probablement l'ouvrage le plus récent et le plus complet sur ce sujet et devrait servir de référence aux chercheurs qui travaillent à la rédaction de directives sur les mélanges de pesticides.

Le Comité a examiné la notion d'utiliser les résultats de toxicité obtenus avec des produits chimiques testés isolément pour l'évaluation des effets de mélanges. Parmi les méthodes passées en revue, mentionnons: l'emploi des propriétés physiques d'un composé (principalement les propriétés lipophiles, le point d'ébullition, le point de fusion, la masse volumique et l'indice de réfraction) comme mesure indirecte des effets toxiques du produit; la combinaison de principes et d'observations physiologiques avec des résultats chimiques et physiques pour produire des modèles du type courbes dose-effet (utilisées avant tout en toxicologie humaine); l'application d'équations théoriques qui tiennent compte des facteurs décrivant des actions indépendantes l'une de l'autre mais simultanées de produits chimiques, des actions semblables et simultanées ainsi que des actions

synergiques, avec comparaison subséquente des effets observés avec les courbes des relations dose-effet produites par ces équations. Cette dernière méthode peut incorporer l'application de rapports structure-activité, mais seulement dans le cas d'effets additifs. Le Comité est arrivé à la conclusion que, malgré le potentiel de ces méthodes, l'application qui en est faite à des mélanges reste largement inconnue. Il faut en savoir plus sur la toxicocynétique, les rapports complets dose-effet, la mutagénèse et la cancérogénèse ainsi que les effets d'une exposition chronique. Il faut également développer une méthodologie permettant de prévoir les effets synergiques et antagonistes. À cette fin, on aurait sans doute avantage à développer des modèles contenant des renseignements sur les voies métaboliques et les sites d'action des produits chimiques.

Le Comité s'est penché sur le choix des espèces servant aux essais sur les effets de mélanges en examinant la sensibilité des organismes présentement utilisés pour les essais sur des espèces étudiées isolément. Il a été constaté que le plus large spectre de renseignements sur la toxicité peut être obtenu avec seulement quelques espèces qui ont les plus grands écarts phylogénétiques et la plus faible corrélation sur le plan de la toxicité. Des résultats ont été présentés pour montrer que les espèces aquatiques offraient la plus vaste gamme de réactions de toxicité et que les animaux aquatiques étaient plus sensibles que les plantes terrestres ou les plantes aquatiques. Par conséquent, le Comité a concentré son attention sur l'utilité des poissons, des invertébrés aquatiques ainsi que des insectes terrestres comme organismes d'essai. D'après un rapport d'accompagnement du *Toxic Substances Control Act* (TSCA, 1982), cette insistance sur des espèces animales peut ne pas être justifiée. Dans le rapport en question, *Selenastrum* est donnée comme étant aussi sensible, sinon davantage, que tout un groupe d'espèces d'invertébrés et de poissons. À propos des essais sur des mélanges de produits chimiques, le Comité fait valoir les points suivants:

a) Il faut choisir avec soin les méthodes d'essais, les conditions du milieu et quelques espèces représentatives qui permettent l'observation de différentes réactions biochimiques.

b) Les espèces servant aux essais peuvent être choisies parmi des groupes sans rapports taxinomiques, mais dont on sait qu'ils sont sensibles à une vaste gamme de produits chimiques de référence.

c) Dans les essais de détermination du synergisme, l'espèce devrait être sensible à différents produits chimiques qui ont différents modes d'action.

d) L'espèce servant aux essais ne doit pas différer nécessairement de celles choisies pour les essais avec des produits chimiques individuels, mais il peut falloir une plus grande précision afin de montrer l'effet combiné d'un mélange de produits chimiques.

e) À l'intérieur d'une même espèce, il peut falloir procéder à des essais couvrant des étapes physiologiques distinctes du cycle évolutif.

f) Il est nécessaire de faire des essais de toxicité chronique lorsque les produits chimiques testés sont persistants ou qu'ils sont déversés constamment.

g) Il faut poursuivre la recherche afin d'identifier des organismes indicateurs utiles pour les essais de toxicité chronique.

Bien qu'on ait accompli des progrès considérables dans l'évaluation des effets de mélanges de produits chimiques sur les poissons et les insectes, le Comité insiste sur le fait qu'il faut parvenir à une meilleure précision dans les essais et qu'il faut procéder à des mesures à différentes étapes du cycle évolutif, dans différentes conditions du milieu et à différentes températures. En outre, le Comité parvient à la conclusion qu'il est essentiel de mettre au point des modèles prédictifs validés si l'on veut éviter le gaspillage de main-d'oeuvre et de ressources, même s'il croit que les essais devraient être étendus à d'autres espèces représentatives.

Le Comité a également examiné les méthodes d'évaluation des effets de mélanges sur les populations, les communautés et les écosystèmes. Dans son rapport, le Comité corrobore nos observations; c'est-à-dire que bien qu'il n'y ait pas de protocole universel, il existe plusieurs méthodes pour étudier les effets des produits chimiques (et leurs mélanges) dans des milieux aquatiques. Il y a moins d'études portant sur les systèmes terrestres. Les méthodes d'étude des populations de poissons sont celles qui sont le plus au point. Les études des populations des milieux terrestres sont rares; les meilleurs exemples sont ceux qui portent sur la réponse de populations d'insectes ou d'oiseaux à différents fongicides et insecticides (Vouk *et al.*, 1987). Les méthodes d'examen des écosystèmes et des communautés en milieu aquatique comprennent les études de croissance d'algues *in situ*, les études portant sur des microcosmes, les études avec des enceintes sur le terrain et, dans quelques cas, la manipulation de systèmes en entier (p. ex. les études d'eutrophisation et des effets des pluies acides dans l'Experimental Lakes Area, Schindler *et al.*, 1980; Vouk *et al.*, 1987). Il y a très peu d'études des méthodes d'évaluation des écosystèmes et des communautés en milieu terrestre, et ces dernières portent essentiellement sur des observations de changements spécifiques ou des variations de populations. Par exemple, avec des espèces forestières et des espèces cryptogames, le remplacement d'une espèce plus sensible par une autre plus tolérante a été attribué à des polluants. Avec d'autres méthodes, on tente de tenir compte de la productivité d'espèces économiques, par exemple, forestières ou agricoles. La plupart des méthodes citées dans la documentation se rapportent aux effets d'émissions atmosphériques.

Dans le rapport du Comité, Cairns et Buikema (1987) décrivent une méthode fonctionnelle pour tester l'effet des mélanges de produits chimiques sur plusieurs espèces

dans un milieu aquatique. Cet essai est fondé sur l'examen d'une communauté de micro-organismes qui vivent dans les interstices et à la surface des sédiments, des mattes d'algues et de moisissures, etc., des écosystèmes aquatiques. Cette communauté comprend plusieurs niveaux trophiques et regroupe des représentants des protozoaires, des algues, des moisissures, des bactéries, des rotifères, des copépodes, etc. Dans cet essai, il s'agit de placer *in situ* des blocs de mousse de polyuréthane à la sortie d'un dispositif servant à la mesure de la toxicité en conditions intermittentes ou dynamiques de milieu, ou encore dans des systèmes en conditions statiques contenant différentes dilutions d'un mélange complexe de produits chimiques. Dans les études sur le terrain, la source des protozoaires pour coloniser les blocs est située en amont du point de contamination ou dans l'environnement naturel du dispositif *in situ*. Lors des études en conditions statiques de milieu ou en conditions dynamiques de milieu, le groupe d'espèces est constitué des populations qui ont déjà colonisé des blocs de mousse de polyuréthane à des endroits de référence et qu'on a ensuite transportés jusqu'au laboratoire. Tant dans les études en laboratoire que sur le terrain, les effets sont mesurés par la surveillance du nombre d'espèces qui envahissent les blocs à différents moments. L'essai de colonisation ne nécessite que la numération du nombre d'espèces ou des types différents. "L'index d'hétérotrophie" constitue une autre mesure possible; il s'agit du rapport de la biomasse constituée par les organismes hétérotrophes plus les organismes autotrophes à la biomasse des organismes autotrophes. Cette dernière est évaluée par des dosages de la chlorophylle tandis que la biomasse des organismes autotrophes et des organismes hétérotrophes combinés est évaluée par la teneur en ATP. La méthode a été testée dans des systèmes en conditions statiques et a donné certains résultats. Elle a pour avantage que ses paramètres représentent une intégration des réponses entre différents mélanges et des éléments abiotiques et biotiques de l'écosystème. En outre, cet essai est peu encombrant et la mesure du paramètre colonisation ne demande aucune expertise en taxinomie. L'installation d'essai se prête à l'étude des effets obtenus avec des produits et leurs mélanges qui sont appliqués par jets périodiques d'une durée, d'une fréquence et d'une amplitude variables. Ce qu'il y a de plus important, c'est que cet essai peut être fait avec de l'eau prise sur place ainsi qu'avec la flore et la faune indigènes. Le dosage de l'ATP peut cependant causer des problèmes. De plus, la base de données est assez limitée.

Le Comité est arrivé à la conclusion qu'une bonne conception des expériences ou de l'échantillonnage est d'importance critique pour les essais faits dans le milieu: il s'agit là d'une conclusion très importante. Il faut un plan de travail équilibré et des témoins. Un effet écologique devrait être déterminé en termes de valeurs statistiques

pondérées par des expériences dans plusieurs systèmes, avec et sans les mélanges de produits testés. Il faut relier la durée d'exposition à la réponse biologique, aux paramètres de l'étude et aux produits constituant le mélange.

Il n'existe pas encore de modèles mathématiques qui permettent l'évaluation de mélanges de produits chimiques; ces modèles pourraient avoir une grande utilité comme appoints aux présentes méthodes et comme instruments heuristiques et exploratoires.

6.2 Effets des produits de dégradation et des produits chimiques ajoutés aux mélanges commerciaux de pesticides

Bien que l'examen de la toxicité des produits de dégradation semble aller de soi, nous n'avons pu trouver qu'un nombre limité d'articles sur le sujet, notamment sur la toxicité pour les plantes terrestres ou aquatiques. Stratton (1984) a étudié les effets de l'atrazine et de ses produits de dégradation sur deux espèces d'algues vertes et trois espèces de cyanobactéries. Ce chercheur a mesuré la photosynthèse (assimilation de $^{14}\text{CO}_2$), l'activité de la nitrogénase (technique de réduction à l'acétylène) et la croissance (absorbance de la lumière à 420-600 nm). Les produits de dégradation ont été testés un à un et en combinaison sur une espèce (*Anabaena inaequalis*). L'atrazine est nettement plus toxique que ses produits de dégradation. En combinaison avec ses produits monodésalkylés, elle a suscité des synergies, des antagonismes et des effets additifs selon la méthode d'essai employée. Par exemple, chaque fois qu'il y en avait dans un mélange, on observait un antagonisme avec la photosynthèse, mais une synergie avec la croissance. Les combinaisons d'atrazine déséthylée et déisopropylée avaient des effets antagonistes sur la photosynthèse et additifs sur la croissance.

O'Kelley et Deason (1976) ont montré que les algues peuvent contribuer à la décomposition des pesticides. Le malathion, le 2,4-DBE et le méthoxychlore semblent tous être décomposés par des algues.

Les agents tensio-actifs, mélangés avec des pesticides pour accroître le pouvoir pénétrant et l'efficacité de ces derniers, exercent leurs propres effets sur les organismes animaux et végétaux. Regupathy et Subramaniam (1973) ont étudié l'effet de deux agents tensio-actifs, le Teepol et le Triton X-100, sur la germination du pollen et l'allongement du tube pollinique de l'aubergine. Ils ont observé qu'à plus de 10 ppm, le Triton X-100 inhibe la germination du pollen et l'allongement du tube pollinique alors que le Teepol n'inhibe pas la germination du pollen mais inhibe l'allongement du tube pollinique à 25 ppm et plus.

Parr (1978) a passé en revue les effets inhibiteurs et phytotoxiques des agents tensio-actifs. L'application de ce type d'agents sur les feuilles ralentit la croissance. Certains de ces produits ont des effets nocifs sur la germination des semences. D'autres effets observés incluent le ralentissement de l'assimilation d'éléments nutritifs et de la translocation, la modification de la perméabilité des parois cellulaires et le ralentissement de la fixation du carbone par photosynthèse. Des recherches sur la toxicité de 100 agents tensio-actifs pour différentes plantes cultivées et à l'état sauvage, notamment le sorgho, le pin à encens, l'ail du Canada, l'orge, le trèfle, le haricot, le maïs, l'avoine et le soja ont mis ces effets en lumière.

Sortkjaer (1984) rapporte certains effets des agents tensio-actifs, notamment ceux du Marlon A sur les macrophytes aquatiques; à 0,5 ppm, il y a eu une réduction importante de la photosynthèse.

Gentile et Gallagher (1972) ont testé 32 formulations de pesticides avec du xylène, du Spreader Sticker de Du Pont et de l'abiétate de diéthylèneglycol sur la germination du pollen et l'allongement du tube pollinique des Saint-Joseph. Le xylène est un solvant et les deux derniers produits chimiques mentionnés sont des adjuvants. Il a été observé que le Spreader Sticker de Du Pont inhibe gravement la germination du pollen à 1000 et 400 ppm et qu'il accroît considérablement la toxicité d'autres pesticides pour le pollen.

La documentation portant sur l'efficacité des produits contient sans aucun doute d'autres ouvrages qui traitent de ces questions, bien qu'en général ces études portent avant tout sur l'efficacité des pesticides dans les zones-cibles plutôt que sur les effets hors cible. Un examen de la documentation sur l'efficacité des produits peut aider à déterminer quels pesticides se décomposent en produits qui sont eux-mêmes autant ou plus toxiques que les composés d'origine. La toxicité des produits d'addition est déjà bien documentée; les essais de toxicité sur ces additifs devraient faire partie des lignes directrices applicables aux essais des pesticides.

6.3 Méthodes d'essais en microcosme et en mésocosme terrestres ainsi que sur le terrain

Notre étude de la documentation et les réponses faites au questionnaire montrent qu'on a porté beaucoup moins d'intérêt à l'étude des écosystèmes, des communautés et des populations terrestres qu'à celle des écosystèmes aquatiques. Certaines des personnes interrogées ont indiqué que l'environnement forestier est celui sur lequel on est

le moins informé à propos des méthodes d'essais et des effets des pesticides. Pour sa revue, le Comité a dû consulter la documentation existante sur les effets des émissions gazeuses. Osburn (1986) observe que la question des effets des pesticides sur des plantes terrestres qui ne sont pas des plantes visées ou des cultures sont mal connus; cela se vérifie spécialement sur le terrain. Le fait qu'il n'y a à peu près pas de méthodologie établie dans ce secteur de recherche met en relief la nécessité de développer et tester des méthodes de travail. Les données recueillies lors des essais d'efficacité pourraient également servir dans ce cas.

6.4 Méthodes d'essais normalisées en microcosme et en mésocosme aquatiques ainsi que sur le terrain

Les méthodes présentées à la section 5.3 ont permis de constater que les études portant sur les écosystèmes, les communautés et les populations aquatiques sont beaucoup plus nombreuses et beaucoup mieux établies que les études portant sur le milieu terrestre. Il y a encore place à une certaine uniformisation de ces types d'études; d'ailleurs, certaines tentatives d'établir des normes ont été faites (TSCA, 1987a, b; Taub et Kindig, 1986). Ces essais normalisés pourraient se révéler assez fiables pour permettre de tirer des conclusions sur certains effets comme les variations de la productivité primaire, l'abondance et la dominance des espèces, les effets à retardement ainsi que les effets secondaires et le rétablissement de la santé des organismes. À ce jour, il n'existe pas encore de méthodes d'essais normalisées en mésocosme ou sur le terrain.

6.5 Méthodes d'extrapolation à partir des résultats d'essais normalisés pour l'évaluation des effets sur le terrain (évaluation des risques)

Les essais de toxicité sont utiles dans la mesure où ils permettent de tirer des conclusions sur les effets réellement obtenus dans le milieu. L'évaluation des risques est un domaine de recherche en soi et il n'est pas question d'en faire une revue détaillée ici, mais plutôt de résumer les grandes questions et les principaux points de vue qui ont cours dans ce domaine, notamment sur l'évaluation de la toxicité des pesticides pour des plantes non visées.

L'évaluation des risques, ou analyse des risques écologiques, est le processus qui mène à l'identification de transformations nocives dans une population, une communauté ou un écosystème, et à la quantification des probabilités de leur apparition, par suite de l'utilisation de pesticides (Sheehan *et al.*, 1987). L'analyse des risques consiste à la fois à identifier des situations problématiques, interactions incluses, et à prédire les risques qui y sont associés, exprimés en probabilités. Les modèles d'évaluation des risques

ont pris deux formes: (a) celle de systèmes subjectifs de pointage qui permettent de calculer à quel consensus des évaluateurs experts parviennent et (b) celle d'instruments appliqués à l'évaluation qui font appel à la simulation d'une exposition ainsi qu'à l'extrapolation de valeurs de toxicité de référence (les instruments d'analyse sont des modèles informatiques). Sheehan *et al.* (1987) ont fait une analyse de l'utilité des différents modèles existants pour l'évaluation des risques dans les milieux aquatiques. Aucun des modèles ne donnait entière satisfaction.

L'un des problèmes liés à l'évaluation des risques, c'est qu'on ne peut s'attendre à ce que les résultats de recherche autres que ceux obtenus dans le cadre d'une évaluation des risques puissent servir adéquatement à cette dernière (Cairns, 1983). Cairns cite en exemple la documentation sur 65 produits chimiques visés par un décret imposé par l'EPA des États-Unis afin de susciter la production de documents de référence. Bien que dans la plupart des cas, les résultats aient été exemplaires au regard des paramètres visés, ces résultats étaient inadéquats pour une évaluation des risques.

Cairns (1983) a également examiné comment les essais séquentiels de toxicité se comparaient aux essais simultanés dans la perspective d'une évaluation des risques. La plupart des systèmes modernes d'évaluation sont constitués d'essais séquentiels (c'est le cas des essais de l'EPA des États-Unis et de l'OCDE qui sont décrits dans le présent rapport). Par paliers ou étapes, la séquence fait passer le chercheur des essais simples et peu coûteux sur des espèces uniques à des essais de plus en plus complexes, raffinés, coûteux et très souvent de longue durée. On admet généralement que le niveau de preuve nécessaire pour faire une estimation sûre des risques varie d'un produit chimique à l'autre; c'est pourquoi il est prévu que les séries d'essais puissent être arrêtées à différentes étapes d'une séquence donnée. On peut s'attendre à ce que seulement quelques-uns des produits chimiques les plus dangereux ou les plus persistants nécessitent la tenue de la batterie complète d'essais. On justifie l'évaluation par étapes de la façon suivante: (a) les essais des étapes supérieures peuvent être faits d'une manière plus efficace si les résultats des essais les plus simples sont disponibles; (b) l'évaluation par étapes permet de réunir suffisamment de résultats pour faire une évaluation valable des risques, mais sans accumuler de résultats inutiles au-delà de ce point; (c) lorsque plusieurs produits chimiques destinés aux mêmes usages doivent être testés, l'évaluation par étapes permet sans doute d'identifier le produit chimique le plus approprié et au moindre coût. Cairns défend les essais simultanés de la façon suivante: (a) à ce jour, rien ne prouve de façon décisive que les essais sur des espèces uniques permettent de prédire avec précision les réactions des écosystèmes, des communautés ou de plusieurs espèces; cela vaut spécialement dans

le cas des effets sublétaux; (b) lorsqu'il constitue un facteur important (à cause des investissements, etc.), le temps mis pour atteindre une masse critique de données sur laquelle porter un jugement adéquat des risques constitue un facteur de coût important; (c) même si la série séquentielle peut refléter le développement historique dans ce domaine, cela ne signifie pas qu'il faut reprendre la même démarche dans le domaine de l'évaluation des risques. En conclusion, Cairns affirme que même si les essais sont parfois coûteux à des niveaux élevés d'organisation, beaucoup sont moins coûteux ou comparables aux études à long terme en milieu dynamique sur des espèces uniques. Par conséquent, si les essais simultanés deviennent un objectif, alors il faut porter beaucoup plus attention à la création d'un ensemble d'essais appropriés sur plusieurs espèces.

L'expression de l'incertitude liée à l'évaluation constitue une autre question qui se rapporte à l'évaluation des risques. Il est possible de déterminer des limites de confiance qui s'appliquent à ces évaluations dans la mesure où l'incertitude inhérente aux données sur lesquelles l'évaluation est fondée est connue ou peut être estimée. Par exemple, l'erreur liée à l'extrapolation des résultats d'une espèce à l'autre, des effets aigus aux effets chroniques et de ceux de la qualité de l'eau en laboratoire à celle sur le terrain peut souvent être estimée à partir de résultats expérimentaux (Suter et al., 1985). En général, plus le nombre d'essais est élevé, moins il y a d'incertitudes, mais chaque gain d'information est moins valable que ceux qui l'ont précédé. Par conséquent, l'art de l'évaluation des risques est de savoir quand on a fait assez d'essais pour parvenir à un niveau acceptable d'incertitude. Suter et al. (1985) proposent un modèle pour montrer qu'une personne désireuse de s'assurer à un haut niveau de confiance qu'un effet ne devrait pas se produire doit être prête à procéder à un nombre très élevé d'essais ou à garder ses modèles simples en écartant un nombre important de facteurs de complexité écologique. D'un autre côté, on peut accepter une incertitude supérieure à 5 p. 100, ce qui réduit le nombre d'essais à faire. Il faut déterminer le niveau de complexité des modèles pour chaque évaluation en optant pour un certain compromis entre la précision, la certitude et le coût.

Gisey (1985) n'a pas la même perception de l'utilité des essais sur plusieurs espèces (microcosmes aquatiques) en vue d'une évaluation des risques. Ce chercheur est d'avis que les essais sur plusieurs espèces n'aident pas à atténuer la subjectivité liée à l'évaluation des risques. Bien que ces essais soient un instrument très puissant et très flexible, notamment en ce qui a trait à la transformation et aux effets de substances xénobiotiques, Gisey pense qu'ils se prêtent mal à l'élaboration de protocoles et n'offrent pas la précision requise par un plan officiel d'évaluation des risques. Il pense que les essais

sur plusieurs espèces peuvent se révéler plus efficaces que la tenue de plusieurs essais sur des espèces uniques à cause d'une plage plus étendue de sensibilité des organismes testés; il reste que ce point n'a pas été établi. "Les essais de toxicité sur plusieurs espèces qui seront le plus utiles seront les essais *in situ* qui permettront une certaine répétition dans un cadre plausible ou ceux sur plusieurs espèces à l'échelle des mésocosmes. Il faut poursuivre la recherche afin de valider les systèmes *in situ*."

La question au coeur de l'évaluation des risques est de trouver des façons pratiques de distinguer les effets acceptables des effets inacceptables sur les écosystèmes. La définition d'effets acceptables ou inacceptables signifie qu'il faut poser un jugement de valeur. Stephan (1986) pense que la meilleure façon d'échafauder un cadre permettant de considérer quels effets sont acceptables ou non est probablement d'utiliser le concept "d'espèces importantes"; celles-ci devraient au moins comprendre des espèces importantes sur le plan commercial, sur le plan récréatif et sur le plan social. Ces espèces pourraient être indigènes ou introduites. Par exemple, les espèces "importantes sur le plan social" pourraient comprendre celles qui sont rares ou menacées de disparition. Stephan propose également de prendre en considération des espèces importantes sur le plan écologique ou des espèces "clés". Le problème avec le choix d'espèces "importantes", c'est que leurs chaînes alimentaires doivent également être protégées. En outre, des effets indirects peuvent aussi nuire gravement aux espèces importantes. Une surveillance sur le terrain est nécessaire pour déterminer s'il y a des effets directs ou indirects qui sont inacceptables, peu importe les mesures prises pour protéger une espèce jugée importante.

La définition d'effets inacceptables dépend et influe sur les effets évalués lors des essais de toxicité. Stephan (1986) propose une liste de sept effets majeurs et jugés inacceptables sur des espèces importantes:

- a) réduction inacceptable de la survie;
- b) réduction inacceptable de la croissance;
- c) réduction inacceptable de la reproduction;
- d) niveau inacceptable d'évitement;
- e) malformations grossières ou tumeurs visibles dans un pourcentage inacceptable d'organismes;
- f) teneurs inacceptables en résidus toxiques des tissus consommés;
- g) goût inacceptable pour la consommation.

La définition de ce qui est inacceptable dépend d'une bonne connaissance de l'écosystème affecté. Par exemple, une mortalité de 10 p. 100 dans une population d'arbres à maturité peut avoir des répercussions plus importantes qu'une mortalité de

10 p. 100 dans une population de semis. Cependant, de petites réductions de survie et de reproduction peuvent se combiner pour conduire à une réduction substantielle d'un peuplement forestier. À l'inverse, un assez important abaissement de la survie ou de la reproduction peut n'avoir qu'un effet mineur sur un peuplement forestier lorsque ce dernier est déjà gravement limité par un autre facteur comme une carence en éléments nutritifs. Stephan pense que si le concept d'effets inacceptables est limité à des effets précis comme ceux dont il est question plus haut et qu'il ne s'applique qu'aux espèces "importantes", alors il ne semble pas avisé d'insister sur l'observation d'effets inacceptables à un niveau élevé. Il suggère qu'une réduction de 5 à 10 p. 100 de la survie, de la croissance ou encore de la reproduction lors d'essais en laboratoire constitue une définition appropriée de ce qui est inacceptable.

Dans une lettre où il répond à notre questionnaire, John Cairns fils résume toutes ses réserves au sujet du présent système en faisant remarquer que "très peu d'attention a été portée à la validation des résultats dans le sens de prévisions explicites pour la protection du milieu (pas la protection des poissons, des crustacés et de la faune terrestre) et de leur validation dans des systèmes naturels ou leurs équivalents". M. Cairns poursuit en expliquant qu'après avoir participé à la production de la collection d'ouvrages "Pellston" sur l'évaluation des risques et après avoir siégé au comité d'écotoxicologie de la National Academy of Sciences, il ne pouvait "simplement pas" accepter le présent système. "Je ne crois tout simplement pas qu'on puisse extrapoler des résultats de façon fiable à partir de systèmes simples qui présentent peu de vraisemblance écologique à des systèmes naturels complexes et très variables. Si c'est possible, alors il faudrait le prouver. Il faudra des années pour recueillir l'information nécessaire, et d'ici là, les présents systèmes ne seront peut-être pas totalement inutiles, juste invalidés."

Il reste encore beaucoup de travail à faire avant de parvenir à une relation optimale entre les essais de toxicité et l'évaluation des risques. Il faudrait prendre comme principe directeur de concevoir des essais de toxicité qui portent sur des sujets précis d'évaluation des risques. Par exemple, ces essais pourraient être faits sur des espèces "importantes" ainsi que sur des espèces sensibles, surtout si l'extrapolation des résultats obtenus avec des espèces sensibles à des espèces importantes est incertaine. En outre, les essais de toxicité doivent tenir compte des effets sur les populations, les communautés et les écosystèmes, du moins jusqu'à ce que la correspondance entre les essais sur des espèces uniques et les essais sur plusieurs espèces soient mieux compris. Enfin, il importe que l'incertitude liée à toute évaluation des risques soit spécifiée et qu'elle soit réduite le plus possible, compte tenu des limites pratiques imposées à tout système de réglementation.

Essai existant	Avantages	Inconvénients	Solution de rechange	Recherche nécessaire
Inhibition de la croissance des algues	Peu coûteux Simple Reproductible Rapide Sensible	Portée insuffisante: trop peu d'espèces, difficulté d'extrapoler à la situation sur le terrain	Algues: technique sur microplaques	Il faut plus de travaux de validation et de vérification de la sensibilité
Inhibition de la croissance de <i>Leimu</i>	Peu coûteux Simple Reproductible Rapide Sensible	Portée insuffisante: il faut d'autres espèces de plantes submergées et flottantes	Algues: essai multi-espèces	Disponibilité et sensibilité des espèces; validation interlaboratoires
Inhibition de la germination, de la croissance et de la vigueur des semis	Peu coûteux Simple	Peu d'expérience: reproductibilité et sensibilité douteuses Paramètres évalués très variables: nécessité d'en utiliser plusieurs	Plantes vasculaires aquatiques: essai sur des plantes submergées ou flottantes	Développement de la méthode: conditions de culture et paramètres évalués; validation inter-laboratoires
Essai sur le terrain avec des plantes aquatiques (EPA seulement)	Indique les effets sur le terrain	Très peu d'expérience de cet essai Pas d'approche uniforme	Plantes vasculaires terrestres: essai d'inhibition de la germination du pollen	Validation interlaboratoires avec des espèces utilisées dans les essais d'inhibition de la germination et de la croissance des semis
Essai sur le terrain avec des plantes terrestres (EPA seulement)	Indique les effets sur le terrain	Très peu d'expérience de cet essai Pas d'approche uniforme	Meilleurs essais d'inhibition de la croissance et de la vigueur Essais en microcosme et sur le terrain: • microcosme • sur le terrain	Il faut de meilleurs paramètres à évaluer et de meilleures techniques de mesure Obtenir de meilleures espèces (sauvages) pour les essais Uniformiser la conception d'un microcosme aquatique Développer un microcosme terrestre Développer un cadre de travail pour les essais sur terrain en milieu aquatique et en milieu terrestre qui repose sur une conception rigoureuse de l'échantillonnage et des paramètres sans ambiguïté; il faut se servir de la recherche faite dans d'autres domaines (pluies acides, métaux lourds)

Tableau 9 révisé à 62% p-125

Un court résumé de nos constatations est présenté au tableau 9, où sont passés en revue les avantages et inconvénients des essais existants, les principales solutions de rechange qui pourraient être incorporées dans les lignes directrices sur les essais et la recherche nécessaire pour amener ces solutions de rechange au niveau de développement requis pour leur incorporation.

TABLEAU 9 RÉSUMÉ DE L'ÉVALUATION DES ESSAIS DE TOXICITÉ POUR
LES PLANTES NON VISÉES

Tamara A. Tolson
Résumé à 60%

7.1 Recommandations pour les lignes directrices canadiennes

7.1.1 Tout produit antiparasitaire. - Effectuer au moins les essais énumérés ci-dessous pour la végétation non visée, sans tenir compte des modes d'emploi: (a) essais d'inhibition de la prolifération algale; (b) essais d'inhibition de la germination, de la croissance et de la vigueur des plantes vasculaires terrestres (les essais portant sur des plantes terrestres ne doivent pas être exigés dans le cas des pesticides employés dans la lutte contre les plantes aquatiques nuisibles seulement).

7.1.2 Pesticides utilisés en milieu aquatique et pesticides susceptibles de migrer vers des habitats aquatiques. - Effectuer obligatoirement un essai *Lemna* (lenticule).

7.1.3 Pesticides persistants susceptibles de pénétrer dans l'environnement aquatique. - Évaluer les effets de ces pesticides sur des macrophytes aquatiques immergés et à racines, en raison de l'importance de ces plantes pour les chaînes alimentaires aquatiques. *Potamogeton pectinatus* ou *Myriophyllum spicatus* conviendraient à ce type d'essai. Il n'existe pas encore de méthodes d'essais normalisées pour ces espèces; par conséquent, nous recommandons l'élaboration de tels essais dans un avenir proche.

7.1.4 Essais sur le terrain. - Tous les toxicologues travaillant dans le domaine de l'environnement s'accordent généralement pour exiger une évaluation sur le terrain de tous les pesticides, car l'extrapolation à partir de résultats obtenus en laboratoire présente des incertitudes. Notre liste minimale ne comporte pas actuellement d'essais sur le terrain, car les pesticides transitoires ou qui migrent peu ne menacent pas beaucoup l'environnement, et on ne dispose pas de méthodes normalisées. Toutefois, nous recommandons fortement d'appuyer et d'encourager l'élaboration d'une méthode d'évaluation sur le terrain et d'inclure une clause exigeant une évaluation sur le terrain dans les lignes directrices sur les essais de toxicité des pesticides pour les plantes non visées dans le cas des pesticides persistants et/ou qui migrent rapidement. Nous déconseillons l'emploi des critères de l'approche en plusieurs étapes utilisée par l'EPA des É.-U. pour justifier la nécessité d'une évaluation sur le terrain; en effet, tout programme arbitraire est sujet à des erreurs, notamment lorsqu'il est basé sur un nombre relativement restreint d'essais. L'exigence d'une évaluation sur le terrain doit être basée sur des données chimiques et le devenir du pesticide dans l'environnement, sur une bonne connaissance de l'écologie des milieux récepteurs et sur des essais en laboratoire de très bonne qualité utilisant une gamme d'espèces aussi vaste que possible.

7.2 Recommandations pour les protocoles d'évaluation

7.2.1 Recommandations générales

a) Nous recommandons d'utiliser le produit formulé, destiné à un usage particulier, dans tous les essais sur la végétation non visée. Cette recommandation s'applique à tous les essais en laboratoire et sur le terrain; en effet, nous aimerions pouvoir comparer un maximum d'essais en laboratoire et d'essais sur le terrain et connaître les effets non encore connus d'un bon nombre d'adjuvants, d'agents tensio-actifs et d'autres additifs utilisés dans les préparations finales. En outre, l'utilisation du produit formulé au lieu de l'ingrédient actif facilite l'évaluation de certains pesticides, car le produit formulé est plus soluble ou du moins plus miscible à l'eau.

b) Tous les essais sur des plantes non visées doivent être effectués avec des doses différentes au lieu d'une dose maximale unique; nous recommandons la méthode de l'OCDE/ISO utilisant au moins cinq concentrations englobant la CE 50 après avoir déterminé la plage de concentrations.

c) Tous les essais doivent comporter une répétition des traitements; nous recommandons au moins trois répétitions par traitement.

d) Il faut exprimer tous les résultats en CL 50 ou CE 50 en donnant une description précise des méthodes statistiques employées et des mesures sur lesquelles est basée l'évaluation des effets (p. ex. croissance, vitesse de croissance, vigueur).

7.2.2 Recommandations pour les essais sur les algues

a) Les essais actuels d'inhibition de la prolifération algale sont généralement satisfaisants, à condition qu'ils durent moins de 72 heures et que la numération cellulaire initiale reste aussi faible que possible (10^4 cellules par millilitre au maximum). En effet, la modification des conditions de l'essai, causée par la production de métabolites des algues et par des variations du milieu, est alors réduite au minimum.

b) Nous recommandons d'employer un ensemble d'espèces pour les essais sur les algues; il faut évaluer au moins un représentant de chaque classe d'algues présente dans le milieu récepteur. L'espèce doit être commune et se rattacher à l'environnement canadien. Il faut continuer à utiliser *Selenastrum capricornutum* même si cette algue n'est pas très représentative, car on a déjà élaboré une vaste base de données sur cette espèce; cependant, on ne doit pas s'y limiter exclusivement. Les espèces devant former l'ensemble peuvent être celles de la liste qui suit, qui n'est toutefois pas exclusive.

Algues bleues (Cyanophycées)

Anabaena flos-aquae
Microcystis aeruginosa
Synechococcus linearis
Pseudoanabaena catenata
Aphanizomenon flos-aquae

Algues vertes (Chlorophycées)

Chlamydomonas reinhardtii
Scenedesmus subspicatus
Scenedesmus quadricauda
Selenastrum capricornutum
Ankistrodesmus falcatus
Chlorella vulgaris

Diatomées (Bacillariophycées)

Nitzschia sp.
Cyclotella sp.

c) La méthode expérimentale des essais d'inhibition de la prolifération algale doit toujours clairement indiquer la façon dont on a estimé la toxicité (par la biomasse ou par la vitesse de croissance). La méthode de l'OCDE qui utilise la CE_{50} (biomasse) ou la CE_{50} (vitesse de croissance) est la seule façon d'atteindre cet objectif.

7.2.3 Recommandations pour les essais sur des macrophytes aquatiques

a) Le protocole actuel d'essai sur *Lemna* de l'EPA est suffisant, mais il faut utiliser différentes doses. L'évaluation des résultats doit être exprimée en CE_{50} , définie selon les effets sur la biomasse (numération des feuilles) ou les effets négatifs (mort des feuilles).

b) Le sous-comité de l'ASTM E-47.01 sur la toxicologie aquatique étudie actuellement les améliorations apportées au protocole d'évaluation de *Lemna*. Le protocole résultant servira de modèle pour les évaluations futures.

7.2.4 Recommandations pour les essais sur les plantes vasculaires terrestres

a) Les essais sur les espèces terrestres doivent porter sur la germination des graines, la croissance et la vigueur en utilisant les méthodes de base de l'EPA ou de l'OCDE (comportant certaines modifications mentionnées ci-après); les essais doivent dépasser le cadre de l'étape initiale de la germination des graines, car la germination n'est peut-être pas l'indicateur le plus sensible de la toxicité.

b) Les essais actuels sur les plantes vasculaires n'ont été ni largement employés ni largement évalués; il faut donc décrire précisément les méthodes et faire connaître les problèmes rencontrés afin de pouvoir apporter au besoin des améliorations.

c) L'espèce utilisée dans les essais sur des plantes terrestres doit présenter les caractéristiques suivantes: être représentative de la diversité du règne végétal et des espèces vivant dans des milieux récepteurs, réagir aux substances toxiques de façon précise et facilement mesurable, présenter une sensibilité déjà connue aux substances toxiques, avoir une croissance et un développement relativement rapides, des besoins limités et non spécifiques pour sa croissance et son développement; elle doit être représentative d'espèces importantes au point de vue économique. La plupart des listes actuelles d'espèces indicatrices sont comparables à la liste de l'OCDE (section 3.2) et à celle du TSCA (section 5.2). Ces espèces satisfont à toutes les exigences ci-dessus à l'exception d'une. On ignore en grande partie leur utilité en tant qu'espèces représentatives d'espèces sauvages.

d) Il faut appliquer les pesticides par pulvérisation foliaire et par l'intermédiaire du milieu de support afin de représenter les deux modes d'exposition sur le terrain. Nous recommandons d'utiliser des milieux de support inerte comme du sable lavé à l'acide ou des billes de verre, afin d'éviter les problèmes d'adsorption liés à l'utilisation du sol.

e) Nous recommandons d'évaluer plusieurs paramètres dans le cas des essais sur des plantes terrestres, car ces essais n'ont pas fait l'objet de recherches suffisantes. Ainsi, il faudrait déduire plusieurs CE_{50} ou CL_{50} à partir d'un paramètre bien précis pour chacune.

7.2.5 Recommandations pour les essais en microcosme, en mésocosme et sur le terrain

a) Il existe actuellement plusieurs modèles de microcosmes aquatiques qu'il convient d'examiner dans le cadre de lignes directrices sur l'évaluation, par exemple les

microcosmes mentionnés dans le TSCA et le microcosme aquatique normalisé (Standardized Aquatic Microcosm) de Taub et Kindig (1986). Des études comparatives ont démontré que les résultats des essais en microcosme concordaient bien avec ceux obtenus sur le terrain et qu'ils donnaient une première approximation sur la façon dont un écosystème réagissait à une substance toxique. Même s'il est souhaitable de normaliser ces essais, le modèle devra présenter plus de souplesse pour tenir compte des différentes caractéristiques du milieu récepteur.

b) Les mésocosmes sont des outils de recherche très utiles, car ils permettent d'établir un rapport entre les études en laboratoire sur une seule espèce à la fois et les études en microcosmes d'une part et les conditions réelles d'autre part; cependant, leur complexité et l'absence de normalisation limitent leur utilité pour les types d'essais exigés actuellement.

c) Les essais sur le terrain doivent faire partie intégrante des lignes directrices sur l'évaluation dès leur mise au point, afin de comporter un type d'échantillonnage rigoureux ainsi que des paramètres indicateurs précis et non équivoques.

d) Un modèle d'échantillonnage rigoureux qui s'applique à des essais sur le terrain doit comporter les points suivants (d'après Green, 1979):

- 1° Énoncer de façon claire et concise la question posée.
- 2° Prendre des échantillons en plusieurs exemplaires à l'intérieur de chaque combinaison de temps, de lieu et de toute autre variable contrôlée. On ne peut mettre en évidence les différences entre les groupes que par des comparaisons avec des différences trouvées dans un même groupe.
- 3° Prendre un nombre égal d'échantillons distribués au hasard pour chaque combinaison de variables contrôlées.
- 4° Prélever deux échantillons là où le paramètre à l'essai est présent et là où il ne l'est pas, toutes les autres conditions étant les mêmes par ailleurs. Un effet ne peut être mis en évidence que par comparaison avec un témoin.
- 5° Effectuer un échantillonnage préliminaire qui servira de base à l'évaluation du modèle d'échantillonnage et à différentes analyses statistiques.
- 6° Vérifier que l'appareil ou la méthode d'échantillonnage traite réellement la population à échantillonner et que l'efficacité soit la même et suffisante pour toute la gamme de conditions d'échantillonnage.
- 7° Si la région à échantillonner correspond à un modèle environnemental à grande échelle, la diviser en sous-régions relativement homogènes et répartir les échantillons dans chaque sous-région, proportionnellement à la superficie. S'il s'agit d'une estimation de l'abondance totale dans toute une région, la distribution doit alors être proportionnelle au nombre d'organismes dans la sous-région.
- 8° Vérifier que la taille unitaire de votre échantillon est appropriée à la taille, à la densité et à la répartition spatiale des organismes à échantillonner. Estimer ensuite le nombre requis d'échantillons prélevés en plusieurs exemplaires pour obtenir la précision désirée.

- 9° Évaluer vos données pour déterminer si la variable aléatoire est homogène, normalement distribuée et indépendante de la moyenne. Dans le cas contraire, comme c'est le cas pour la plupart des données sur le terrain, (i) transformer alors les données de façon appropriée; (ii) utiliser une méthode non paramétrique (non basée sur la distribution d'échantillonnage); (iii) utiliser un plan d'échantillonnage séquentiel approprié; ou (iv) tester les données par rapport à des données simulées pour H_0 .
- 10° Après avoir choisi la meilleure méthode statistique pour vérifier votre hypothèse, tenez-vous en à votre résultat.

e) Les essais sur le terrain doivent être suffisamment longs pour mettre en évidence la capacité de rétablissement de l'écosystème et les effets du pesticide à des périodes critiques (p. ex. la nouaison).

f) Au nombre des paramètres à évaluer lors des essais sur le terrain on compte: la production primaire, la respiration des communautés, les rapports production-respiration, la fixation de l'azote, la composition et(ou) l'abondance des espèces.

g) Les paramètres à évaluer seront précis dans la mesure où avant d'effectuer l'essai, on se met d'accord sur la signification d'un impact négatif; par exemple, "si la photosynthèse de la communauté est inhibée à plus de 50 p. 100, il y aura d'importantes répercussions à long terme sur l'environnement". La définition d'un impact négatif dépendra de la connaissance de l'écosystème étudié. Cette connaissance peut être fondée sur des études en laboratoire portant sur une seule espèce, sur des travaux en microcosme et en mésocosme et sur des travaux antérieurs sur le terrain. À mesure que les recherches sur l'évaluation des plantes non visées avancent, il faut élaborer une base de données qui facilitera la définition des impacts négatifs.

7.3. Recommandations pour les recherches ultérieures et la mise au point d'essais

a) Les milieux utilisés pour les essais sur des algues ont toujours contenu suffisamment d'éléments nutritifs; nous recommandons d'effectuer des recherches sur l'utilisation d'un facteur limitant représenté par la quantité d'éléments nutritifs lorsque le milieu récepteur est susceptible de contenir des plans d'eau où la quantité d'éléments nutritifs est faible.

b) Nous sommes arrivés à la conclusion que la technique sur microplaques est très prometteuse dans le cas des essais sur des algues, en raison de sa rapidité, de son efficacité et de son coût peu élevé; nous recommandons d'effectuer une évaluation et une validation plus poussées de cette méthode tout en cherchant à intégrer cet essai dans les protocoles d'évaluation obligatoire à l'avenir.

c) La nécessité d'avoir des protocoles d'évaluation pour des macrophytes aquatiques à racines se fait sentir; nous recommandons d'effectuer des recherches sur les méthodes mentionnées dans la littérature à ce sujet et de favoriser le perfectionnement des protocoles, ainsi que des essais interlaboratoires.

d) La quasi-totalité des espèces couramment utilisées dans les essais sur des plantes terrestres sont des espèces commerciales, c'est pourquoi il est nécessaire de connaître la façon dont on peut les utiliser pour prévoir les effets toxiques sur des espèces importantes dans la nature. Nous proposons d'utiliser les données relatives aux espèces adventices visées pour élargir la liste des espèces terrestres évaluées, car les espèces adventices sont souvent des espèces importantes dans les milieux naturels. En particulier, il faudrait ajouter des espèces forestières à la liste.

e) Il faut effectuer une évaluation et une validation plus poussées des améliorations à apporter aux techniques d'évaluation des plantes vasculaires terrestres; par exemple, il faut introduire dès que possible dans les protocoles exigés les améliorations apportées aux méthodes d'allongement des racines.

f) Il faut effectuer des essais de germination du pollen avec les pesticides utilisés au cours de la floraison et dans des habitats où la reproduction sexuelle est importante, par exemple, avec des insecticides employés en milieu forestier et des fongicides employés en agriculture. Les essais de germination du pollen sont largement décrits dans la littérature; il faut mettre au point un protocole normalisé à partir de la documentation tout en tenant compte des conseils des chercheurs qui utilisent actuellement ces essais.

g) Les modèles de microcosmes terrestres sont relativement rares, mais on trouve suffisamment de données dans la documentation pour orienter des recherches plus poussées sur un modèle de microcosme terrestre plus normalisé; il faut encourager et aider des recherches de cette nature.

h) Il faut encourager et aider les recherches en mésocosme et pouvoir ainsi utiliser les résultats pour perfectionner les essais en laboratoire et sur le terrain.

i) Les lignes directrices sur l'évaluation des pesticides doivent obligatoirement exiger des essais sur le terrain. Il existe des méthodes qui peuvent être adaptées à l'évaluation de pesticides sur des plantes non visées. Il faut effectuer d'autres recherches de façon à élaborer et à insérer dans les lignes directrices les méthodes qui conviennent à la végétation non visée.

RÉFÉRENCES

- Adams, W.J., R.A. Kimerle, B.B. Heidolph et P.R. Michael (1983). "Field comparison of laboratory-derived acute and chronic toxicity data", *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Sixth Symposium*. ASTM STP 802. W.E. Bishop, R.D. Cardwell et B.B. Heidolph (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, pp. 367-385.
- Agarwal, S. (1983). "Seed germination: a model system for the toxicity of pesticides", *Biol. Mem.*, 8 (1 et 2): 172-183.
- Agriculture Canada (1984). Guide d'homologation: guide d'homologation des pesticides et autres produits homologués en vertu de la Loi sur les produits antiparasitaires (Canada). Division des pesticides, Ottawa, 37 pages (inclut les Circulaires à la profession T-1-237 à T-1-241)
- Australian DPI (1985). Requirements for Clearance of Agricultural Chemicals. Agricultural and Veterinary Chemicals Section, Department of Primary Industry, Canberra, Australie.
- Bishop, W.E. et R.L. Perry (1981). "Development and evaluation of a flow-through growth inhibition test with duckweed (*Lemna Minor*)", *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fourth Conference*. D.R. Branson et K.L. Dickson (éd.), American Society for Testing and Materials, pp. 421-435.
- Blaise, C.R. Communication personnelle. Protection de l'environnement, Environnement Canada, Longueuil, Québec.
- Blaise, C.R., R. Legault, N. Bermingham, R. Van Coillie et P. Vasseur (1986). "A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment", *Toxicity Assessment: An International Quarterly*, John Wiley & Sons, 1: 261-281.
- Blanck, H. (1984). "Species dependent variation among aquatic organisms in their sensitivity to chemicals", *Ecol. Bull. (Stockholm)*, 36: 107-119.
- Borthwick, P.W., J.R. Clark, R.M. Montgomery, J.M. Patrick Jr. et E.M. Lores (1985). "Field confirmation of a laboratory-derived hazard assessment of the acute toxicity of fenthion to pink shrimp, *Penaeus duorarum*", *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium*. ASTM STP 891. R.C. Bahner et D.J. Hansen (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, pp. 177-189.
- Boyle, T.P. (1985). "Research needs in validating and determining the predictability of laboratory data to the field", *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium*. R.C. Bahner et D.J. Hansen (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie.
- Boyle, T.P., S.E. Finger, R.L. Paulson et C.F. Rabeni (1985). "Comparison of laboratory and field assessment of fluorene - Part II: Effects on the ecological structure and function of experimental pond ecosystems", *Validation and Predictability of Laboratory Methods for Assessing the Fate and Effects of Contamination in Aquatic Ecosystems*. T.P. Boyle (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, pp. 134-151.

- Bristow, P.R. et G.E. Windom (1987). "Effects of selected fungicides, insecticides and adjuvants on *in vitro* germination of highbush blueberry pollen", *Plant Disease*, 71(4): 326-328.
- Brockway, D.L., P.D. Smith et F.E. Stancil (1984). "Fate and effects of atrazine in small aquatic microcosms", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 32: 45-53.
- Brooker, M.P. et R.W. Edwards (1973). "Effects of the herbicide paraquat on the ecology of a reservoir", *Freshwater Biol.*, 3: 157-175.
- Bryfogle, B.M. et W.F. McDuffett (1979). "Algal succession in laboratory microcosms as affected by an herbicide stress", *Amer. Midl. Nat.*, 101(2): 344-354.
- Cairns, Jr., J. (1983). "The case for simultaneous toxicity testing at different levels of biological organization", *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Sixth Symposium. ASTM STP 802*. W.E. Bishop, R.D. Cardwell et B.B. Heidolph (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, pp. 111-127.
- Cairns, Jr., J. et A.L. Bulkema Jr. (1987). "Estimating the impact of pulses of mixtures of chemicals upon aquatic organisms", *Methods for Assessing the Effects of Mixtures of Chemicals*. V.B. Vouk, G.C. Butler, A.C. Upton, D.V. Parke et S.C. Asher (éd.). John Wiley & Sons, Toronto, pp. 285-300.
- Campbell, P.G.C. et P.M. Stokes (1985). "Acidification and toxicity of metals to aquatic biota", *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, 42: 2034-2049.
- Canadian Inter-Governmental Aquatic Toxicity Advisory Group (IGATG) (1986). "Sublethal growth inhibition/stimulation testing protocols and procedures for unicellular green alga", Addendum 2, Part I to Report: Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection, Conservation et Protection, Environnement Canada.
- Castrilli, J.F. et T. Vigod (1987). *Pesticides au Canada: étude de la législation et de la politique fédérale. Étude préparée pour le compte de la Commission de la réforme du droit*, Ottawa, Canada, n° de cat. J32-3/39, 131 pages.
- Christoffers, D. et D.E.W. Ernst (1983). "The *in vivo* fluorescence of *Chlorella fusca* as a biological test for the inhibition of photosynthesis", *Toxicol. Environ. Chem.*, 7: 61-71.
- Church, R.M. et R.R. Williams (1977). "The toxicity to apple pollen of several fungicides, as demonstrated by *in vivo* and *in vitro* techniques", *J. Horticult. Sci.*, 52: 429-436.
- Cole, D.M. (1976). *Herbicides Used for Control of Lesser Vegetation Damage to Young Lodgepole Pine*. United States Department of Agriculture Forest Service, Ogden (UT), 4 pages.
- Communauté économique européenne (CEE) (1987). *Méthodes de détermination de l'éco-toxicité; essai d'inhibition algale*. Directive CEE 79/831, Annexe V, partie C.
- Communauté économique européenne (CEE) (1979). *Directive du Conseil du 18 septembre 1979, portant sixième modification de la directive 67/548/CEE concernant le*

- rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses, Directive 79/831/CEE du 18 septembre 1979.
- Craker, L.E (1981). The Determination of Phytotoxicity. U.S. Army Medical Engineering Research and Development Laboratory, Fort Detrick, Frederick (MD), 37 pages.
- Crawford, S.A. (1981). "Successional events following simazine application", *Hydrobiologia*, 77: 217-223.
- Davies, A.G. (1978). "Pollution studies with marine plankton. Part 2: Heavy metals", *Adv. Mar. Biol.*, 15: 381-508.
- Davis, E. (1980). Effect of Herbicides on Submerged Seed Plants. Office of Water Research and Technology, Washington, W800685 OWRTA-067-ALA(2), 17 pages.
- Davis, F.S., A. Villasreal, J.R. Baur et I.S. Goldstein (1972). "Herbicidal concentrations of picloram in cell culture and leaf buds", *Weed Sci.*, 20(2): 185-188.
- Davis, J.A. (1981). Comparison of Static-replacement and Flow-through Bioassays Using Duckweed, *Lemna gibba* G-3. Office of Pesticides and Toxic Substances, United States Environmental Protection Agency, Washington, EPA 560/6-81-003.
- Day (Smith) K., N.K. Kaushik, K.R. Solomon et C.T. Corke (1981). The Effects of Atrazine in a Lake Ecosystem Using Large Volume (125 m³) *in situ* Enclosures. Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques.
- DeFilippis, L.F., R. Hampp et H. Ziegler (1981). "The effects of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on *Euglena*. Growth and pigments", *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 101: 37-47.
- deNoyelles, F., W.D. Kettle et D.E Sinn (1982). "The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States", *Ecology*, 63(5): 1285-1293.
- deNoyelles Jr., F. et W.D. Kettle (1985). "Experimental ponds for evaluating bioassay predictions", Validation and Predictability of Laboratory Methods for Assessing the Fate and Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems. T.P. Boyle (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, pp. 91-103.
- Edwards, N.T. et B.M. Ross-Todd (1980). "An improved bioassay technique used in solid waste leachate phytotoxicity research", *Environ. Exp. Bot.*, 20: 31-38.
- Eloranta, V. (1982). "Effect of the slimeicide Fennosan F 50 on algal growth in different test media", *Papeni ja Puu*, 64(3): 129-135.
- Fairchild, J.F., T.W. LaPoint et T.P. Boyle (1987). "Influence of ecosystem attributes on the results of toxicity tests conducted in pond-sized mesocosms", 7th International Symposium, North American Lake Management Society, Applied Lake Management: The Role of Standards in Water Resource Management Policy, Orlando, Floride.
- Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (FIFRA) (1986). Federal Register. Code of federal regulations, protection of environment - data requirements for

- registration, revised as of July 1, 1986. Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration, U.S. EPA, 158. 40, pp. 44-92.
- Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act (FIFRA) (1984). Federal Register. Part II, Environmental Protection Agency, 40 CFR Part 158, Data requirements for pesticide registration; final rule. Federal Register/Rules and Regulations. U.S. EPA, 49-207.
- Fisher, N.S. et C.F. Wurster (1973). "Individual and combined effects of temperature and polychlorinated biphenyls on the growth of three species of phytoplankton", *Environ. Poll.*, 5: 205-212.
- Francis, B.M. et R.L. Metcalf (1981). Screening of Pesticides for Potential Adverse Environmental Effects in Illinois. Institute of Environmental Studies and Department of Entomology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign, 98 pages.
- Fukuda, H. (1987). Registration and Inspection of Pesticides in Agriculture. ZEN-NOH Agricultural Technical Center, Division of Pesticides, National Institute of Agro-Environmental Sciences, Kannondai 3-1-1, Yatabe-Machi, Tsukuba-Gun, Ibaraki-Ken 305, Japon, pp. 1-6.
- Garten Jr., C.T. et M.L. Frank (1984). Comparison of Toxicity to Terrestrial Plants with Algal Growth Inhibition by Herbicides. Office of Pesticides and Toxic Substances, United States Environmental Protection Agency, Washington, Publication No. 2361, 39 pages.
- Gentile, A.G., A.W. Vaughan et D.G. Pfeiffer (1978). "Cucumber pollen germination and tube elongation inhibited or reduced by pesticides and adjuvants", *Environ. Entomol.*, 7: 689-691.
- Gentile, A.G., A.W. Vaughan, S.M. Richman et A.T. Eaton (1973). "Corn pollen germination and tube elongation inhibited or reduced by commercial and experimental formulations of pesticides and adjuvants", *Environ. Entomol.*, 2(3): 473-476.
- Gentile, A.G. et K.J. Gallagher (1972). "Pollen germination and tube elongation in petunia inhibited or reduced by commercial formulations of pesticides *in vitro*", *J. Econ. Entomol.*, 65(2): 488-491.
- Giddings, J.M. et P.J. Franco (1985). "Calibration of laboratory bioassays with results from microcosms and ponds", *Validation and Predictability of Laboratory Methods for Assessing the Fate and Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems*. T.P. Boyle (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, pp. 104-119.
- Gisey, J.P. (1985). "Multispecies tests: research needs to assess the effects of chemicals on aquatic life", *Aquatic Toxicology and Hazard Assessments: Eighth Symposium*. ASTM STP 891. R.C. Bahner et D.J. Hansen (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, pp. 66-77.
- Gile, J.D., J.C. Collins et J.W. Gillett (1981). "Fate of selected herbicides in a terrestrial laboratory microcosm", *Environ. Sci. Tech.*, 14(9): 1124-1128.

- Gillet, J.W. et J.M. Witt (éd.) (1979). "Terrestrial microcosms", Proceedings of the Workshop on Terrestrial Microcosms, Symposium on Terrestrial Microcosms and Environmental Chemistry. Applied Science and Research Applications, National Science Foundation, Washington. United States Environmental Protection Agency Project No. 1EA714.
- Green, R.H. (1979). Sampling Design and Statistical Methods for Environmental Biologists. John Wiley & Sons, Toronto, 218 pages.
- Greene, J. Communication personnelle. Pacific Northwest Water Laboratory, United States Environmental Protection Agency, Corvallis, Oregon.
- Hall, J. (1986). "The interaction of chronic copper toxicity with nutrient limitation in two chlorophytes". Thèse de doctorat, Université du Manitoba, Winnipeg, Manitoba.
- Hamala, J.A. et H.P. Kollig (1985). "The effects of atrazine on periphyton communities in controlled laboratory ecosystems", *Chemosphere*, 14(9): 1391-1408.
- Hansen, C. Communication personnelle. Écotoxicologiste, National Agency for Environmental Protection, Denmark.
- Harrass, M.C. et F.B. Taub (1985). "Comparison of laboratory microcosms and field responses to copper", Validation and Predictability of Laboratory Methods for Assessing the Fate and Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystem. T.P. Boyle (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, pp. 57-74.
- Hatzios, K.K. et D. Penner (1982). Metabolism of Herbicides in Higher Plants. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 102 pages.
- Hollister, T.A. et G.E. Walsh (1973). "Differential responses of marine phytoplankton to herbicides: oxygen evolution", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 9(5): 291-295.
- Holm, H.W., H.P. Kollig, L.M. Proctor et W.R. Payne Jr. (1982). Laboratory Ecosystems for Studying Chemical Fate: an Evaluation Using Methyl Parathion. Research and Development, United States Environmental Protection Agency, Athens, EPA-600/S3- 82-020, 3 pages.
- Holst, R.W. Communication personnelle. United States Environmental Protection Agency, Crystal City, Washington.
- Holst, R.W. et T.C. Ellwanger (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision J, Hazard Evaluation: Nontarget Plants. Office of Pesticide and Toxic Substances, United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Ibrahim, A. (1984). "Effects of some pesticides on growth rate of the microscopic algae *Ankistrodesmus falcatus* (Corda) Ralfs, *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breg. and *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin)", *Aqua*. (5): 303-306.
- Ibrahim, A.E. (1983). "Effects of some common pesticides on growth and metabolism of the unicellular algae *Skeletonema costatum*, *Amphiprora paludosa*, and *Phaeodactylum tricornutum*", *Aquat. Toxicol.*, 3: 1-14.

- Isensee, A.R. et R.S. Yockim (1980). Freshwater Micro-ecosystem Development and Testing of Substitute Chemicals, Pesticide Degradation Laboratory, Beltsville, Maryland, NTIS No. PB80-151533, 26 pages.
- Kaushik, N.K., G.L. Stephenson, K.R. Solomon, et K.E. Day (1985). "Impact of permethrin on zooplankton communities in limnocorrals", Can. J. Fish. Aquat. Sci., 42: 77-85.
- Kenaga, E.E. (1987). "Methods for assessing the effects on non-human biota of mixtures of chemicals as applied to specific taxonomic representatives of individual or groups of species", Methods for Assessing the Effects of Mixtures of Chemicals. B.V. Vouk, G.C. Butler, A.C. Upton, D.V. Parke et S.C. Asher (éd.). SCOPE.
- Kenaga, E.E. (1981). "Range of toxicity of 131,596 chemicals to plant seeds", Ecotoxicol. Environ. Saf., 5: 469-475 (cité dans Kenaga, 1987).
- Kenaga, E.E. et K.G. Chambers (1980). "Range of toxicity of 13,409 chemicals to bacteria and fungi". The Dow Chemical Company, Health and Environmental Sciences, Midland, Michigan, rapport non publié (cité dans Kenaga, 1987).
- Kenaga, E.E. et R.J. Moolenaar (1979). "Fish and daphnia toxicity as surrogates for aquatic vascular plants and algae", Environ. Sci. Technol., 13: 1479-1480 (cité dans Kenaga, 1987).
- Klaassen, H.E. et A.M. Kadoum (1979). "Distribution and retention of atrazine and carbofuran in farm pond ecosystems", Arch. Environ. Contam. Toxicol., 8: 345-353.
- Kosinski, R.J. (1984). "The effect of terrestrial herbicides on the community structure of stream periphyton", Environ. Poll., 36: 165-189.
- Kosinski, R.J. et M.G. Merkle (1984). "The effect of four terrestrial herbicides on the productivity of artificial stream algal communities", J. Environ. Qual., 13(1): 75-82.
- Lockhart, W.L. et A.P. Blouw (1979). "Phytotoxicity tests using the duckweed *Lemna minor*", Canadian Special Publication of Fish. Aquat. Sci., Toxicity Tests Freshwater Organisms, 44: 112-118.
- Lockhart, W.L., B.N. Billeck, B.G.E. de March et D.C.G. Muir (1983). "Uptake and toxicity of organic compounds: studies with an aquatic macrophyte (*Lemna minor*)", Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Sixth Symposium. ASTM STP 802. American Society for Testing and Materials. W.E. Bishop, R.D. Cardwell et B.B. Heidolph (éd.), pp. 460-468.
- Lukavsky, J. Communication personnelle. Czechoslovak Academy of Sciences, Institute of Botany, Department of Hydrobotany, Dukelska.
- Lusse, B., D. Schroder et C.J. Soeder (1986). "The bromothymol-blue test: a simple algal bioassay and its use for herbicide screening", Arch. Hydrobiol. Suppl., 73(1): 147-152.
- Martenson, L. Communication personnelle. Head, Chemicals Branch, National Agency for Environmental Protection, Denmark.

- Metcalfe, R.L. (1975). Evaluation of Laboratory Microcosm for Study of Toxic Substances in the Environment. Final Technical Report, July 1, 1973 - December 31, 1975. University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana. NTIS No. PB-252 982, 66 pages.
- Moody, R.P., P. Weinberger et R. Greenhalgh (1981). "Algal fluorometric determination of the potential phytotoxicity of environmental pollutants", Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques, 1151: 93-104.
- Morris, I. (1974). "Nitrogen assimilation and protein synthesis", Algal Physiology and Biochemistry. W.D.P. Stewart (éd.), Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Neuhold, J.M. (1986). "Toward a meaningful interaction between ecology and aquatic toxicology", Aquatic Toxicology and Environmental Fate. T.M. Poston et R. Purdy (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, pp. 11-21.
- Nyholm, N. Communication personnelle. Scientific Director, Water Quality Institute, Danish Academy of Technical Sciences, Horsholm, Danemark.
- Nyholm, N. (1985). "Response variable in algal growth inhibition tests - biomass or growth rate?", Water Res., 19: 273-279.
- O'Kelly, J.C. et T.R. Deason (1976). Degradation of Pesticides by Algae. Office of Research and Development, United States Environmental Protection Agency, Athènes, GA. EPA-600/3-76-022.
- Organisation de coopération et de développement économiques (1986a). Groupe des produits chimiques et comité de gestion, Commission de mise à jour, Compte rendu de la quatorzième réunion tenue à Paris les 2 et 3 octobre 1986.
- Organisation de coopération et de développement économiques (1986b). Groupe des produits chimiques et comité de gestion, projet sur l'évaluation des dangers. Rapport de l'atelier sur les méthodes pratiques d'évaluation de l'exposition de l'environnement. Direction générale de l'environnement, OCDE, ENV/CHEM/CM/86.8. 113 pages.
- Organisation de coopération et de développement économiques (1984). Deuxième supplément aux Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Paris.
- Organisation de coopération et de développement économiques (1981). Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Paris.
- Organisation de coopération et de développement économiques (1980). Report on the Assessment of Potential Environmental Effects of Chemicals: The Effects on Organisms Other Than Man on Ecosystems. Volume I. Division of Technology for Society TNO Department of Biology, Study and Information Centre TNO for Environmental Research, Delft, Hollande.
- Organisation de coopération et de développement économiques (1979). Programme de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Groupe d'experts sur la dégradation/accumulation, rapport final, volume 1, OCDE, Paris.

- Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (1982). Rapport de la deuxième consultation gouvernementale sur l'harmonisation internationale des critères d'homologation des pesticides. Rome, octobre 1982.
- Organisation internationale de normalisation (1987). Méthode provisoire. Qualité de l'eau - Test d'inhibition de la croissance des algues. ISO/TC 147. Nederlands Normalisatie-instituut, Delft, Hollande.
- Osborn, D. (1986). "Effects of pesticides on non-target organisms", Toxic Hazard Assess. Chem. Conference Proceedings. M. Richardson (éd.), pp. 247-258.
- Parr, J.F. (1978). "Toxicology of adjuvants", Adjuvants for herbicides. Weed Science Society of America. Champaign (Ill.), pp. 93-113.
- Peterson, H.G. (1988). "Toxic substances and algae: the influence of morphology, taxonomy and physiological state". Saskatchewan Research Council, Saskatoon, Saskatchewan (non publié).
- Peterson, H.G. et F.P. Healey (1985). "Comparative pH dependent metal inhibition of nutrient uptake by *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae)", J. Phycol., 21: 217-222.
- Peterson, H.G., F.P. Healey et R. Wagemann (1984). "Metal toxicity to algae: a highly pH dependent phenomenon", Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41(6): 974-979.
- Plumley, F.G. et D.E. Davis (1980). "The effects of a photosynthesis inhibitor atrazine on salt marsh edaphic algae, in culture, microecosystems, and in the field", Estuaries, 3(4): 271-277.
- Ratsch, H.C. et D. Johndro (1986). "Comparative toxicity of six test chemicals to lettuce using two root elongation test methods", Environ. Monitor. Assess., 6(3): 267-276.
- Rawn, G.P., G.R.B. Webster et D.C.G. Muir (1982). "Fate of permethrin in model outdoor ponds", J. Environ. Health., B17: 463-486.
- Regupathy, A. et T.R. Subramaniam (1974). "Effect of surfactants on the in vitro germination of pollen of bitter-gourd (*Momordica charantia* L.)", J. Horticult. Sci., 49: 197-198.
- Regupathy, A. et T.R. Subramaniam (1973). "Effect of surfactants on pollen germination and pollen tube growth in eggplant (*Solanum melongena* L.)", Phytoparasitica, 1(2): 115-116.
- Santelmann, P.W. (1977). "Herbicide bioassay", Research Methods in Weed Science, 2^e édition. B. Truelove (éd.), Southern Weed Science Society, Auburn, Alabama, pp. 79-87.
- Schindler, D.W. (1978). "Factors regulating phytoplankton production and standing crop in the world's fresh waters", Limnol. Oceanogr., 23: 478-486.
- Sergy, G.A. (1987). Recommendations of Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection, Conservation et Protection, Environnement Canada, Edmonton.

- Sheehan, P.J. (1987). "Functional processes of ecosystems: their use in assessing the effects of mixtures of chemicals", *Methods for Assessing the Effects of Mixtures of Chemicals*. V.B. Vouk, G.C. Butler, A.C. Upton, D.V. Parke et S.C. Asher (éd.), John Wiley & Sons, Toronto, pp. 691-707.
- Sheehan, P.J., A. Baril, P. Mineau, D.K. Smith, A. Harfemst et W.K. Marshall (1987). *The Impact of Pesticides on the Ecology of Prairie Nesting Ducks*. Service canadien de la faune, Conservation et Protection, Environnement Canada. Technical Report Series No. 19.
- Shivanna, K.R. (1972). "Effect of nonionic surfactants on pollen germination and pollen tube growth", *Current Sci.*, 41: 609-610.
- Simon, J.E., D.R. Decoteau et L.E. Craker (1983). "Detection of phytotoxic compounds using stress-induced ethylene and ethane", *Environ. Tech. Lett.*, 4: 157-162.
- Skulberg, O.M. (1978). "Symposium: Experimental use of algal cultures in limnology, Sandefjord, Norway, October 26-28, 1976", *Mitt. Int. Verein. Limnol.*, 21: 1-4.
- Société canadienne des limnologistes (1988). Septième conférence annuelle, 6-7 janvier 1988.
- Soeder, C.J. et E. Stengel (1974). "Physio-chemical factors affecting metabolism and growth rate", *Algal Physiology and Biochemistry*. W.D.P. Stewart (éd.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 714-740.
- Solomon, K.R., J.Y. Yoo, D. Lean, N.K. Kaushik, K.E. Day et G.L. Stephenson (1985). "Dissipation of permethrin in limnocorrals", *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 70-76.
- Solomon, K.R., K. Smith, G. Guest, J.Y. Yoo et N.K. Kaushik (1980). "Use of limnocorrals in studying the effects of pesticides in the aquatic ecosystem", *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 975: 1-9.
- Solomon, K.R., K. Smith et G.L. Stephenson (1982). "Depth integrating samplers for use in limnocorrals", *Hydrobiologia (The Hague)*, 94: 71-75.
- Sortkjaer, O. (1984). "Macrophytes and macrophyte communities as test systems in ecotoxicological studies of aquatic systems", *Ecol. Bull. (Stockholm)*, 36: 75-80.
- Stephan, C.E. (1986). "Proposal goal of applied aquatic toxicology", *Aquatic Toxicology and Environmental Fate*. T.M. Poston et R. Purdy (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, pp. 3-10.
- Strange, R.J. (1976). "Nutrient release and community metabolism following application of herbicide to macrophytes in microcosms", *J. Appl. Ecol.*, 13(3): 889-897.
- Stratton, G.W. (1984). "Effects of the herbicide atrazine and its degradation products, alone and in combination, on phototrophic microorganisms", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 13: 35-42.
- Sun, M. (1987). "EPA's predicament of regulating pesticides", *Science*, 238: 20-21.

- Suter II, G.W., L.W. Barnthouse, J.E. Breck, R.H. Gardner et R.V. O'Neil (1985). "Extrapolating from the laboratory to the field: how uncertain are you?", Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Seventh Symposium. ASTM STP 854. R.D. Cardwell, R. Purdy et R.C. Bahner (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, pp. 400-413.
- Tagatz, M.E. et J.M. Ivey (1981). "Effects of fenvalerate on field- and laboratory-developed estuarine benthic communities", Bull. Environ. Contam. Toxicol., 27: 256-267.
- Taub, F.B. et A.C. Kindig (1986). Interlaboratory testing of an aquatic microcosm protocol. Final Report, Section II of V, Standardized aquatic protocol. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Rockville, Maryland.
- Thomas Jr., V.M., L.J. Buckley, J.D. Sullivan et M. Ikawa (1973). "Effect of herbicides on the growth of *Chlorella* and *Bacillus* using the paper disc method", Weed Sci., 21(5): 449-451.
- Tooby, T.E. (1978). "A scheme for the evaluation of hazards to non-target aquatic organisms from the use of chemicals", Proceedings, European Weed Research Society 5th Symposium on Aquatic Weeds, pp. 287-294.
- Toxic Substances Control Act (TSCA) (1987a). Guidelines. Federal Register, Part II, Environmental Protection Agency, 40CFR parts 796-797. Federal Register/Rules and Regulations. U.S. EPA, 52, p. 87.
- Toxic Substances Control Act (TSCA) (1987b). Revision of TSCA test guidelines. Federal Register/Rules and Regulations. U.S. EPA, 52, p. 97.
- Toxic Substances Control Act (TSCA) (1982). Environmental effects test guidelines. Guidelines and Support Documents for Environmental Effects Testing. U.S. EPA, Washington.
- Toxic Substances Control Act (TSCA) (1981a). Technical support document for plant uptake and translocation test standard (Draft). Section 4. Health and Environmental Review Division Office of Toxic Substances, U.S. EPA, Washington.
- Toxic Substances Control Act (TSCA) (1981b). Technical support document for seed germination/root elongation test standard (Draft). Section 4. Health and Environmental Review Division, Office of Toxic Substances, U.S. EPA, Washington.
- Toxic Substances Control Act (TSCA) (1981c). Technical support document for early seedling growth test standard (Draft). Section 4. Health and Environmental Review Division, Office of Toxic Substances, U.S. EPA, Washington.
- Truelove, B., D.E. Davis et L.R. Jones (1974). "A new method for detecting photosynthesis inhibitors", Weed Sci., 22: 15-17.
- Turbak, S.C., S.B. Olson et G.A. McFeters (1986). "Comparison of algal assay systems for detecting waterborne herbicides and metals", Water Res., 20(1): 91-96.

- Ulrich, W., G. Benecke et M. Noll (1982). "The inhibition of blue-green algae - an ecotoxicological rapid bio-assay of water screening", *Medicales.*, 106: 227-234.
- United Kingdom Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (U.K. MAFF) (1984). Pesticides Registration in the United Kingdom. The work of the Pesticides Registration Department at Harpenden.
- United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1987a). Guidance for the Reregistration of Pesticide Products Containing Paraquat Dichloride as the Active Ingredient. Office of Pesticide Programs, U.S. EPA, Washington, 195 pages.
- United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1987b). Guidance for the Reregistration of Pesticide Products Containing Prometryn as the Active Ingredient. Office of Pesticide Programs, U.S. EPA, Washington, 119 pages.
- United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1986). Guidance for the Reregistration of Pesticide Products Containing Glyphosate as the Active Ingredient. Office of Pesticide Programs, U.S. EPA, Washington, 207 pages.
- United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1985). Guidance for the Reregistration of Pesticide Products Containing Picloram as the Active Ingredient. Office of Pesticide Programs, U.S. EPA, Washington, 105 pages.
- United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1982). Hexazinone (3-cyclohexyl-6-(dimethylamino)-1-methyl-1,3,5-triazine -2,4 (1H, 3H)-dione): Pesticide Registration Standard. Office of Pesticide and Toxic Substances, U.S. EPA, Washington.
- United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1978). The *Selenastrum capricornutum* Printz Algal Assay Bottle Tests: Experimental Design, Application and Data Interpretation Protocol. PB-286 950. Pacific Northwest Lab., Corvallis.
- United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (1971). Algal Assay Procedure Bottle Test. PB-258 419. Pacific Northwest Lab., Corvallis.
- Van der Werf, B., J. Schrotenboer, A.F. Richter, J.R. Moed, H.L. Hoogveld et H. De Haan (1987). "A durable and transportable limnetic enclosure system suitable for wind-exposed lakes", *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44: 1649-1652.
- Venkatarman, G.S. et B. Rajyalakshmi (1972). "Relative tolerance of nitrogen-fixing blue-green algae to pesticides", *Indian J. Agric. Sci.*, 42(2): 119-121.
- Vouk, V.B., G.C. Butler, A.C. Upton, D.V. Parke et S.C. Asher (éd.) (1987). Methods for Assessing the Effects of Mixtures of Chemicals. SCOPE 30, SGOMSEC 3. United Nations Environment Programme, International Labour Organization and World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, IPSC Joint Symposia 6, John Wiley & Sons, Toronto, 871 pages.
- Walsh, G.E. (1983). "Cell death and inhibition of population growth of marine unicellular algae by pesticides", *Aquat. Toxicol.*, 3: 209-214.

- Walsh, G.E. et S.V. Alexander (1980). "A marine algal bioassay method: results with pesticides and industrial wastes", *Water Air Soil Pollut.*, 13: 45-55.
- Walsh, G.E. (1972). "Effects of herbicides on photosynthesis and growth of marine unicellular algae", *Hyacinth Contr. J.*, 10:45-48.
- Walsh, G.E., C.W. Miller et P.T. Heitmuller (1971). "Uptake and effects of dichlobenil in a small pond", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 6(3): 279-288.
- Wong, P.T.S. et P. Couture (1986). "Toxicity screening using phytoplankton", *Toxicity Testing Using Microorganisms. Volume II.* B.J. Dutka et G. Bitton (éd.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Floride, pp. 79-100.
- Yoo, J.Y. et K.R. Solomon (1981). "Persistence of permethrin, atrazine and methoxychlor in a natural lake system", *Can. Tech. Rep. Fish Aquat. Sci.*
- Yoshida, T., T. Maruyama, H.I. Kojima, I. Allahpichay et S. Mori (1986). "Evaluation of the effect of chemicals on aquatic ecosystem by observing the photosynthetic activity of a macrophyte, *Porphyra yezoensis*", *Aquat. Toxicol.*, 9(4-5): 207-214.
- Zabkiewicz, J.A. (1979). "Evaluation of herbicide activity after root uptake by gorse and radiata pine seedlings grown hydroponically", *Proceedings of the 32nd New Zealand Weed and Pest Control Conference, Dunedin*, pp. 319-323.
- Zilkah, S. et J. Gressel (1977a). "Cell cultures vs. whole plants for measuring phytotoxicity; III. Correlations between phytotoxicities in cell suspension cultures, calli and seedlings", *Plant Cell Physiol.*, 18: 815-820.
- Zilkah, S. et J. Gressel (1977b). "Cell cultures vs. whole plants for measuring phytotoxicity: I. The establishment and growth of callus and suspension cultures; definition of factors affecting toxicity on calli", *Plant Cell Physiol.*, 18: 641-655.
- Zilkah, S., P.F. Bocion et J. Gressel (1977). "Cell cultures vs. whole plants for measuring phytotoxicity. II. Correlations between phytotoxicity in seedlings and calli", *Plant Cell Physiol.*, 18: 657-670.

f 144 p 2, m 11

ANNEXE

QUESTIONNAIRE SUR LES ESSAIS DE DÉTERMINATION
DE LA TOXICITÉ DES PESTICIDES POUR LES PLANTES NON VISÉES

NOM _____

ADRESSE _____

N° DE TÉL. _____

Partie 1 Essais normalisés de toxicité des pesticides pour les plantes - méthodes simples

1. Décrire brièvement l'expérience que vous avez dans la détermination de la toxicité des pesticides.
2. Que pensez-vous des essais actuels de toxicité des pesticides pour les plantes non visées (par exemple, essais d'inhibition de la germination et de l'émergence des semis, essais sur des algues et sur *Lemna*) relativement à:
 - a) leur portée?
 - b) leur reproductibilité?
 - c) leurs avantages et leurs inconvénients?
3. Quels paramètres préférez-vous employer pour les essais de phytotoxicité:
 - a) dans le cas des espèces vasculaires?
 - b) dans le cas des algues?
4. Selon vous, quelles espèces indicatrices seraient le plus représentatives des espèces indigènes du Canada?
5. Que pensez-vous de l'approche par étapes adoptée par l'EPA des États-Unis (où les résultats des essais de chaque étape dictent le passage d'une étape à l'autre)?

Partie 2 Responsabilité du déclarant - méthodes complexes

6. Est-il possible pour tout laboratoire compétent de prendre la section Materials and Methods de la proposition d'homologation d'un pesticide et de refaire les essais avec des résultats similaires?
7. Si oui, à quelle étape de "complexité" devrait-on arrêter? Pensez-vous que les essais de toxicité sur des systèmes complexes, comme les essais sur le terrain, sont suffisamment reproductibles pour pouvoir être inclus dans les protocoles associés à la réglementation?

Si vous estimez que les essais sur le terrain sont trop complexes, obtiendrait-on une meilleure compréhension de l'impact d'une substance toxique sur des systèmes à plusieurs espèces en:

8. Étudiant les interactions en mésocosme? Si oui, sur quels critères devrait-on se baser pour le choix de la taille et des espèces?
9. Employant l'approche de la batterie d'essais? Cette dernière devrait inclure des tests bien définis pour le choix d'espèces représentatives des communautés les plus sensibles trouvées dans les milieux naturels. Les espèces devraient être choisies davantage pour leur sensibilité que parce qu'elles proviennent d'une région en particulier. Le raisonnement derrière cette approche est que le groupe d'espèces choisies est représentatif des groupes multi-espèces les plus sensibles trouvés dans les milieux naturels. Les laboratoires indépendants devraient pouvoir répéter les essais avec des résultats similaires.
10. Si les questions 8 ou 9 sont la responsabilité des fabricants de produits chimiques, préféreriez-vous qu'un lien entre 8, 9 et les essais sur le terrain soit établi? Si oui, qui devrait faire ce travail (la personne qui veut faire homologuer le pesticide ou des groupes de chercheurs indépendants)?
11. Quelle devrait être l'importance des essais sur le terrain? Dans quel cas? Avec quel type de pesticides?
12. Dans l'approche par étapes de l'EPA des États-Unis pour l'homologation des pesticides, les essais sur le terrain sont exigés à la troisième étape seulement. Les essais sur le terrain devraient-ils être employés avant pour avoir plus d'impact sur l'homologation d'un produit?

