

LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Essai de 21 jours sur les poissons : Essai de dépistage à court terme de l'activité estrogénique et androgénique, et de l'inhibition de l'aromatase

INTRODUCTION

1. Le développement et la validation d'un essai sur les poissons, capable de détecter des substances agissant sur le système endocrinien, sont devenus nécessaires du fait des inquiétudes suscitées par la présence dans l'environnement de produits chimiques à des concentrations susceptibles d'avoir des effets néfastes sur l'homme et la faune sauvage. En 1998, l'OCDE a lancé une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les lignes directrices existantes et à élaborer de nouvelles lignes directrices concernant le dépistage et l'essai d'éventuels perturbateurs endocriniens. L'un des volets de cette activité consistait à élaborer une Ligne directrice pour le dépistage des substances actives sur le système endocrinien des poissons. L'essai de 21 jours pour le dépistage des perturbateurs endocriniens des poissons a fait l'objet d'un programme de validation très complet comprenant des études inter-laboratoires portant sur une série de substances et visant à démontrer la pertinence et la fiabilité de l'essai pour la détection des agonistes/antagonistes des œstrogènes, des androgènes et de l'enzyme aromatase (1, 2, 3, 4, 5) chez trois espèces de poissons (le tête-de-boule (*Pimephales promelas*), le medaka japonais (*Oryzias latipes*) et le poisson-zèbre (*Danio rerio*)); la détection de l'activité androgénique est possible chez le tête-de-boule et le medaka, mais pas chez le poisson zèbre. Cette Ligne directrice (TG230) ne permet pas la détection des antagonistes des androgènes. Les travaux de validation ont été revus par un comité composé d'experts désignés par les Coordinateurs nationaux du Programme sur les Lignes directrices pour les essais (6). Cet essai n'est pas conçu pour identifier les mécanismes spécifiques du dérèglement hormonal dans la mesure où les animaux d'essai possèdent un axe hypothalamo-hypophyséogonadique (HHG) sain et sont en mesure de réagir aux substances ayant des effets sur l'axe HHG à différents niveaux. L'essai à court terme de reproduction des poissons (TG 229) prend en compte la mesure de la fécondité, et le cas échéant l'histopathologie gonadique pour le tête-de-boule, ainsi que les observations mesurées dans la présente Ligne directrice (TG 230). La Ligne directrice TG 229 permet un dépistage des substances qui affectent la reproduction par différents mécanismes, y compris des mécanismes endocriniens. Ces différences entre les deux Lignes directrices devraient être prises en compte pour choisir celle qui répond le mieux aux besoins.

2. La présente Ligne directrice décrit un essai de dépistage *in vivo* sur des groupes de poissons (composés de mâles sexuellement matures et de femelles reproductrices) exposés à une substance pendant une durée limitée de leur cycle biologique (21 jours). A l'issue de cette période d'exposition de 21 jours, en fonction de l'espèce testée un ou deux biomarqueur(s) sont mesurés chez les mâles et les femelles pour servir d'indicateurs des effets de la substance d'essai sur l'activité oestrogénique, androgénique ou sur l'inhibition de l'aromatase. Ces biomarqueurs sont la vitellogénine (VTG) et les caractères sexuels secondaires. La vitellogénine est dosée chez le tête-de-boule, le medaka japonais et le poisson-zèbre tandis que les caractères sexuels secondaires sont mesurés chez le tête-de-boule et le medaka japonais uniquement.

3. Ce bio-essai sert d'essai de dépistage *in vivo* pour certains modes d'action liés au système endocrinien, et son application est envisagée dans le contexte du « Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation de perturbateurs endocriniens ».

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. La vitellogénine (VTG) est normalement produite par le foie des femelles vertébrées ovipares en réponse à la circulation d'œstrogènes endogènes. Il s'agit d'un précurseur des protéines du vitellus, produit par le foie puis acheminé par le sang vers les ovaires, où il est capté et modifié par les ovocytes en croissance. La vitellogénine est quasiment indétectable dans le plasma des poissons mâles et femelles immatures, et ce en raison d'une présence insuffisante d'œstrogènes circulants ; néanmoins, le foie peut synthétiser et sécréter la vitellogénine en réponse à une stimulation œstrogénique exogène.

5. Le dosage de la vitellogénine sert à détecter les substances ayant une action (anti-)œstrogénique. Cette détection peut se faire par la mesure de l'induction de vitellogénine chez les poissons mâles ; elle a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques dans des revues à comité de lecture (7, par exemple). L'induction de vitellogénine a également été démontrée suite à une exposition à des androgènes aromatisables (8, 9). La diminution du taux d'œstrogènes circulants chez les femelles sous l'effet, par exemple, de l'inhibition de l'aromatase, l'enzyme permettant de convertir l'androgène endogène en œstrogène naturel (17 β -œstradiol), engendre une diminution du niveau de vitellogénine utilisée pour détecter les inhibiteurs d'aromatase (10, 11). La pertinence biologique de la réponse donnée par la vitellogénine suite à l'inhibition des œstrogènes/de l'aromatase est établie et a été abondamment étudiée. Néanmoins la production de VTG chez les femelles peut également être affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non-endocriniens (hépatotoxicité, par exemple).

6. Plusieurs méthodes de mesure ont été développées avec succès et normalisées en vue d'essais de routine. Ainsi, le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) est un principe de reconnaissance immunologique couplé à une réaction enzymatique permettant de doser la vitellogénine à partir de prélèvements sanguins ou hépatiques effectués sur des poissons (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Les échantillons sont prélevés sur trois espèces: le tête-de-boule (sang), le poisson-zèbre (sang ou homogénat tête/queue) et le medaka (foie). Chez le medaka, il existe une bonne corrélation entre la concentration sanguine et la concentration hépatique de VTG (19). Les procédures recommandées pour les prélèvements effectués à des fins de dosage de la vitellogénine sont décrites à l'[annexe 6](#). Des kits de dosage de la vitellogénine sont largement disponibles ; ils sont fondés sur une méthode ELISA validée et spécifique de l'espèce testée.

7. Les caractères sexuels secondaires des poissons mâles de certaines espèces sont visibles à l'œil nu, quantifiables et réactifs aux taux d'androgènes endogènes circulants; c'est le cas pour le tête-de-boule et le medaka mais pas pour le poisson-zèbre, qui ne possède pas de caractères sexuels secondaires quantifiables. Les femelles conservent la capacité de développer des caractères sexuels secondaires masculins en cas d'exposition à des substances androgènes présentes dans l'eau. Un certain nombre d'études scientifiques traitent de ce type de réponse chez le tête-de-boule (20) et le medaka (21). La dégénérescence des caractères sexuels secondaires chez les mâles est interprétée avec prudence en raison de leur faible puissance statistique. Par ailleurs, toute interprétation en la matière est fondée sur un jugement expert et sur l'analyse du poids de la preuve. L'utilisation du poisson-zèbre pour cet essai a ses limites compte tenu de l'absence, chez cette espèce, de caractères sexuels secondaires quantifiables, réactifs aux substances agissant sur les androgènes.

8. Chez le tête-de-boule, le nombre de tubercules nuptiaux situés sur le museau des femelles constitue le principal indicateur d'exposition à des androgènes exogènes. Chez le medaka femelle, le nombre de tubercules papillaires constitue le principal indicateur d'exposition à des androgènes exogènes. Les recommandations sur les procédures à suivre pour évaluer les caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka figurent respectivement à l'[annexe 5a](#) et l'[annexe 5b](#).

9. Les définitions utilisées dans cette Ligne directrice pour les essais sont présentées à l'[annexe 1](#).

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. Lors de l'essai, des poissons mâles et femelles en état de se reproduire sont placés ensemble dans des cuves où ils sont exposés à des substances chimiques. Leur état d'adultes reproducteurs permet une différenciation claire entre les deux sexes, et donc une analyse de chaque biomarqueur en fonction du sexe; il garantit également leur sensibilité aux substances exogènes. A la fin de l'essai, le sexe est confirmé par un examen macroscopique des gonades après incision de l'abdomen avec des ciseaux. Un tableau récapitulatif des conditions expérimentales pertinentes figure à l'[annexe 2](#). Pour cet essai on sélectionne normalement des poissons en état de frayer ; les animaux sénescents sont écartés. La section relative à la *sélection des poissons* donne des indications sur l'âge des poissons et sur leur état reproducteur. Trois concentrations d'essai ainsi qu'une cuve témoin contenant de l'eau sont utilisées. Un autre témoin contenant un solvant peut être utilisé si nécessaire. Deux cuves ou répliquats par traitement sont utilisées (chaque cuve contenant 5 mâles et 5 femelles) pour le medaka et le poisson-zèbre ; quatre cuves ou répliquats par traitement sont utilisées (chaque cuve comprenant 2 mâles et 4 femelles) pour le tête-de-boule. Ce principe permet de tenir compte du comportement territorial des têtes-de-boule mâles tout en maintenant la puissance de l'essai à un niveau suffisant. La durée d'exposition est de 21 jours ; le prélèvement des poissons est effectué le 21^e jour.

11. Le 21^e jour, tous les poissons sont euthanasiés. Les caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka sont évalués (cf. [annexe 5A](#) et [annexe 5B](#)) ; des prélèvements sanguins sont effectués pour le dosage de la vitellogénine chez le poisson-zèbre et le tête-de-boule, mais un homogénat tête/queue peut aussi être utilisé pour le dosage de la vitellogénine chez le poisson-zèbre ([annexe 6](#)) ; des prélèvements hépatiques sont effectués pour le dosage de la VTG chez le medaka ([annexe 6](#)).

CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

12. Pour que les résultats de l'essai soient acceptables, les conditions sont les suivantes:

- La mortalité dans les cuves témoins (eau ou solvant) ne dépasse pas 10 pour cent à la fin de la période d'exposition;
- La concentration d'oxygène dissous est maintenue à 60 pour cent au moins de la valeur de la saturation en air (VSA) durant toute la période d'exposition;
- A aucun moment, durant toute la période d'exposition, la température de l'eau ne diffère de plus de ± 1.5 °C entre les cuves, et elle demeure à l'intérieur d'un intervalle de 2°C compris dans la plage de température indiquée pour l'espèce étudiée ([annexe 2](#));
- Les données disponibles démontrent que la concentration de la substance d'essai en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

13. On utilise du matériel courant de laboratoire et en particulier:

- (a) un pH-mètre et un appareil à mesurer l'oxygène;
- (b) un instrument pour mesurer la dureté et l'alcalinité de l'eau;
- (c) un dispositif adéquat de régulation de la température avec, de préférence, une surveillance en continu;
- (d) des cuves en matériau chimiquement inerte et d'une capacité adaptée à la charge et à la densité de peuplement recommandées ([annexe 2](#));
- (e) un substrat de frai pour les têtes-de-boule et les poissons-zèbres (voir [annexe 4](#));

- (f) une balance suffisamment précise (précision de $\pm 0.5\text{mg}$).

Eau

14. On utilise une eau dans laquelle l'espèce testée présente des taux adéquats de croissance et de survie à long terme. Sa qualité demeure constante pendant la durée de l'essai. Le pH de l'eau est compris entre 6.5 et 8.5 sans varier de plus de ± 0.5 unité de pH au cours d'un même essai. Pour s'assurer que l'eau de dilution ne modifiera pas le résultat de l'essai (notamment par complexation de la substance d'essai), on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, etc.), des principaux anions et cations (Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4 , etc.), des pesticides (total des pesticides organophosphorés et organochlorés, etc.), du carbone organique total et des solides en suspension est effectué tous les trois mois, par exemple, pour une eau de dilution dont on sait que sa qualité est relativement constante. Si la qualité de l'eau s'est révélée constante durant au moins un an, on peut espacer les mesures (tous les six mois, par exemple). Certaines caractéristiques chimiques pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'[annexe 3](#).

Solutions d'essai

15. Des solutions d'essai sont ajustées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. La solution mère est, de préférence, préparée par simple mélange ou agitation de la substance d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (secouement ou ultrasons, par exemple). Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour réaliser une solution mère de concentration adéquate. L'emploi d'un véhicule solvant n'est pas recommandé mais peut s'avérer nécessaire. Dans ce cas, il faut tester en parallèle une cuve témoin contenant la même concentration de solvant que les cuves contenant la substance. Pour les substances difficiles à tester, un solvant peut être la meilleure solution technique et le Document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges « difficiles » devrait être consulté (22). Le choix du solvant est déterminé par les propriétés chimiques de la substance. Le Document d'orientation de l'OCDE recommande de ne pas dépasser une concentration maximale de $100\mu\text{l/l}$. Toutefois une étude récente (23) a montré que l'utilisation de solvants lors des essais de substances ayant des effets sur le système endocrinien pouvait poser d'autres problèmes. Si l'utilisation d'un solvant s'avère nécessaire, il est donc recommandé de réduire sa concentration à un minimum dans toute la mesure des possibilités techniques (qui dépendent des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai).

16. On utilise un essai dynamique requérant un système qui délivre et dilue en continu une solution mère de la substance d'essai (pompe doseuse, dilueur proportionnel, système de saturation, par exemple) pour appliquer une série de concentrations dans les enceintes d'essai. Le débit des solutions mères et de l'eau de dilution est vérifié périodiquement, de préférence tous les jours, pendant la durée de l'essai et ne varie pas de plus de 10 % durant l'essai. Il faut veiller à éviter l'utilisation de tubes en plastique de mauvaise qualité ou autres matériaux pouvant contenir des substances biologiquement actives. Pour la sélection du matériel pour l'essai dynamique, l'adsorption possible de la substance d'essai sur le matériel est prise en compte.

Maintenance des poissons

17. Les poissons d'essai sont sélectionnés parmi une population de laboratoire, issue de préférence d'une même lignée, qui a été acclimatée pendant au moins deux semaines avant l'essai dans des conditions de qualité de l'eau et d'éclairage similaires à celles de l'essai. Il importe que le taux de charge et la densité de peuplement (voir les définitions à l'[annexe 1](#)) soient adaptés à l'espèce testée (voir [annexe 2](#)).

18. Après une période d'acclimatation de 48 heures, on note les mortalités et on applique les critères suivants :

- mortalité supérieure à 10 % de la population en sept jours : le lot entier est rejeté;
- mortalité comprise entre 5 et 10 % de la population: la période d'acclimatation est prolongée de sept jours ; si la mortalité dépasse 5 % durant la deuxième période de 7 jours, le lot entier est rejeté;
- mortalité inférieure à 5 % de la population en sept jours : le lot est accepté.

19. Les poissons ne reçoivent pas de traitement pour maladie durant les périodes d'acclimatation, de pré-exposition et d'exposition.

Pré-exposition et sélection des poissons

20. Pendant la période de pré-exposition (recommandée d'une semaine), les poissons sont placés dans des cuves similaires à celles de l'essai. Il est préférable de nourrir les poissons *ad libitum* durant toute la période d'acclimatation et d'exposition. La période d'exposition débute avec des adultes sexuellement dimorphes issus d'une population de laboratoire d'animaux sexuellement matures (présentant, par exemple, des caractères sexuels secondaires visibles à l'œil nu en ce qui concerne le tête-de-boule et le medaka), se reproduisant activement. A titre d'orientation générale (ne devant pas être prise en considération indépendamment de l'observation de l'état reproducteur du lot entier), le poisson tête-de-boule est âgé d'environ 20 (± 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant son élevage; le medaka japonais est âgé d'environ 16 (± 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant son élevage; et le poisson-zèbre est âgé d'environ 16 (± 2) semaines, s'il a bénéficié d'une température de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant son élevage.

CONCEPTION DE L'ESSAI

21. Trois concentrations de la substance d'essai ainsi qu'une cuve témoin (contenant de l'eau) sont utilisées. Un autre témoin contenant un solvant peut être utilisé si nécessaire. Les données peuvent faire l'objet d'analyses statistiques permettant de déceler les différences significatives entre les réponses correspondant à chaque niveau de concentration et au témoin. Plutôt que de servir à l'évaluation des risques, ces analyses sont utiles pour déterminer si la substance chimique doit faire l'objet de tests afin d'évaluer ses éventuels effets néfastes à plus long terme (survie, développement, croissance et reproduction) (24).

22. Pour les espèces medaka et poisson-zèbre, des échantillons sont prélevés le 21^{ème} jour dans les groupes traités à chaque niveau de concentration (chacun des deux répliquats comprenant 5 mâles et 5 femelles) et dans chaque groupe témoin en vue du dosage de la vitellogénine et de l'évaluation des caractères sexuels secondaires, le cas échéant. Pour les têtes-de-boule, des échantillons sont prélevés le 21^{ème} jour dans les groupes traités à chaque niveau de concentration (chacun des quatre répliquats comprenant 2 mâles et 4 femelles) et dans chaque groupe témoin en vue du dosage de la vitellogénine et de l'évaluation des caractères sexuels secondaires.

Sélection des concentrations d'essai

23. Pour les besoins de l'essai, la concentration la plus forte est déterminée en fonction de la concentration maximale tolérée (CMT) obtenue à partir d'un essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai ou à partir d'autres données de toxicité, est fixée à 10 mg/l, ou est déterminée en

fonction de la solubilité maximale dans l'eau, selon la valeur qui est la plus basse. La CMT est définie comme la concentration d'essai maximale de la substance engendrant un taux de mortalité inférieur à 10 %. L'utilisation de cette approche suppose l'existence de données empiriques sur la toxicité aiguë ou d'autres données de toxicité à partir desquelles la CMT pourra être estimée. L'estimation de la CMT peut être inexacte et requiert généralement un jugement expert.

24. Trois concentrations d'essai, espacées par un facteur constant ne dépassant pas 10, et une cuve témoin contenant l'eau de dilution (plus, si nécessaire, une cuve contenant un solvant) sont nécessaires. Les facteurs d'espacement sont situés entre 3.2 et 10.

MODE OPERATOIRE

Sélection et pesée des poissons d'essai

25. Il importe de veiller à ce que le poids des poissons varie le moins possible au début de l'essai. L'annexe 2 indique les gammes de poids qui conviennent aux différentes espèces recommandées pour cet essai. Si possible, au début de l'essai, la gamme des poids de l'ensemble des poissons mâles et femelles du lot utilisé ne sort pas d'un intervalle de $\pm 20\%$ autour de la moyenne arithmétique de chaque sexe. On recommande de peser un sous-échantillon de poissons avant l'essai afin d'estimer le poids moyen.

Conditions d'exposition

Durée

26. La durée de l'essai est de 21 jours, après une période de pré-exposition. La durée de pré-exposition recommandée est de une semaine.

Alimentation

27. Les poissons reçoivent *ad libitum* une nourriture appropriée (annexe 2) en quantité suffisante pour maintenir leur condition physique. Il faut veiller à prévenir la prolifération de micro-organismes et la turbidité de l'eau. A titre d'indication générale, la ration quotidienne peut être divisée en deux ou trois parts égales administrées à trois heures d'intervalle au moins. Une seule ration plus conséquente est acceptable, notamment le week-end. Les poissons sont privés de nourriture pendant les 12 heures qui précèdent les prélèvements/l'autopsie.

28. Le dosage des contaminants [pesticides organochlorés, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), biphényles polychlorés (PCB)] est effectué dans la nourriture. La nourriture présentant une forte concentration de phytoestrogènes qui compromettraient la réponse de l'essai à un agoniste œstrogénique connu (17 β -œstradiol, par exemple) est évitée.

29. Les aliments non consommés et les matières fécales sont retirés des cuves au moins deux fois par semaine, par un nettoyage soigneux du fond de chaque cuve à l'aide d'un siphon, par exemple.

Lumière et température

30. La photopériode et la température de l'eau sont adaptées à l'espèce testée (voir annexe 2).

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

31. Avant le début de la période d'exposition, le bon fonctionnement du système de distribution de la substance est vérifié. Toutes les méthodes analytiques nécessaires sont établies, y compris des

connaissances suffisantes sur la stabilité de la substance dans le système d'essai. Pendant l'essai, les concentrations de la substance d'essai sont déterminées à intervalles réguliers, en vérifiant de préférence chaque jour, mais à défaut au moins deux fois par semaine, le débit du diluant et celui de la solution mère de substance toxique. Ces débits ne varient pas de plus de 10 % pendant toute la durée de l'essai. Il est recommandé de mesurer les concentrations de la substance d'essai dans chaque cuve au début de l'essai puis chaque semaine.

32. Il est recommandé de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si la concentration de la substance d'essai en solution a été correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de $\pm 20\%$ autour de la concentration nominale, les résultats peuvent être calculés à partir des valeurs nominales ou mesurées.

33. Les échantillons peuvent avoir besoin d'être filtrés (avec des pores de $0.45\ \mu\text{m}$, par exemple) ou centrifugés. Si elle est nécessaire, la centrifugation est la procédure recommandée. Cependant, si le matériel d'essai ne s'adsorbe pas sur le filtre, la filtration est également acceptable.

34. Pendant l'essai, l'oxygène dissous, la température et le pH sont mesurés dans toutes les cuves au moins une fois par semaine. La dureté totale et l'alcalinité sont mesurées au moins une fois par semaine dans les cuves témoins et dans une cuve contenant la concentration la plus forte. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins une cuve d'essai.

Observations

35. Un certain nombre de réponses biologiques générales (survie, par exemple) et ciblées par l'essai (niveaux de vitellogénine, par exemple) sont évaluées au cours ou à la fin de l'essai. Le contrôle quantitatif de la fécondité peut être effectué quotidiennement si cela est requis par l'autorité réglementaire. La mesure et l'évaluation de ces biomarqueurs ainsi que leur utilité sont décrits dans la suite de cette Ligne directrice.

Survie

36. Il convient d'examiner les poissons quotidiennement durant l'essai. Les décès sont notés et les poissons morts retirés de la cuve dès que possible. Les poissons morts ne sont pas remplacés dans les cuves témoins ou les cuves contenant la substance. Le sexe des poissons morts durant l'essai est déterminé par observation macroscopique des gonades.

Comportement et apparence

37. Tout comportement anormal (par rapport aux témoins) est noté, car il peut être un signe de toxicité générale (hyperventilation, nage non coordonnée, perte d'équilibre, immobilité ou alimentation atypiques). Il convient en outre de relever les éventuelles anomalies externes (hémorragie, décoloration, par exemple). La prudence s'impose lors de l'interprétation de ces signes de toxicité dans la mesure où ceux-ci peuvent révéler des concentrations auxquelles les biomarqueurs d'effets potentiels sur le système endocrinien ne sont pas fiables. Ces observations sur le comportement peuvent aussi fournir des informations qualitatives utiles pour les futures exigences potentielles en matière d'essais sur les poissons. On a ainsi pu observer une agressivité territoriale chez les têtes-de-boule mâles normaux ou chez les têtes-de-boule femelles masculinisées en cas d'exposition à des androgènes. Le comportement caractéristique d'accouplement et de reproduction du poisson-zèbre après les premières lueurs de l'aube est réduit ou entravé par l'exposition aux œstrogènes ou aux anti-androgènes.

38. La manipulation des poissons pouvant engendrer une modification rapide de certaines caractéristiques physiques (notamment la couleur), il importe de procéder aux observations qualitatives

avant le retrait des poissons du système expérimental. Les expériences menées jusqu'à présent sur le tête-de-boule donnent à penser que certains perturbateurs endocriniens peuvent d'emblée avoir des effets sur les caractéristiques physiques suivantes: couleur (claire ou sombre), motifs de coloration (présence de bandes verticales) et forme du corps (région de la tête et région pectorale). Les observations relatives aux caractéristiques physiques des poissons sont donc notées au cours et à la fin de l'essai.

Euthanasie des poissons

39. Le 21^{ème} jour, c'est-à-dire à la fin de la période d'exposition, les poissons sont euthanasiés à l'aide de quantités de tricaine appropriées [solution de 100-500 mg/l de méthanesulphonate de tricaine (MS 222) (CAS.886-86-2) tamponnée avec 300 mg/l de NaHCO₃ (bicarbonate de sodium, CAS.144-55-8)] destinées à réduire l'irritation de la muqueuse; des prélèvements de sang et de tissus sont ensuite effectués pour le dosage de la vitellogénine (voir la section sur la vitellogénine).

Observation des caractères sexuels secondaires

40. Certains perturbateurs endocriniens peuvent avoir des effets sur des caractères sexuels secondaires spécialisés (nombre de tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule mâle et de tubercules papillaires chez le medaka mâle). Certaines substances peuvent notamment engendrer l'apparition anormale de caractères sexuels secondaires chez les animaux du sexe opposé. Ainsi les agonistes des récepteurs d'androgènes tels que le trenbolone, la méthyltestostérone et la dihydrotestostérone peuvent provoquer l'apparition de tubercules nuptiaux proéminents chez le tête-de-boule femelle et celle de tubercules papillaires chez le medaka femelle (20, 11, 21). On a pu noter également que les agonistes des récepteurs d'œstrogènes peuvent réduire le nombre de tubercules nuptiaux et la taille de l'amas graisseux situé sur la tête des adultes mâles de tête-de-boule (25, 26). Ces observations morphologiques macroscopiques peuvent fournir des informations qualitatives et quantitatives utiles pour fonder d'éventuelles exigences futures en matière d'essais sur les poissons. Le nombre et la taille des tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule ainsi que ceux des tubercules papillaires chez le medaka peuvent être quantifiés directement, ou de manière plus pratique sur des spécimens préservés. Les recommandations sur les procédures applicables pour l'évaluation des caractères sexuels secondaires du tête-de-boule et du medaka figurent respectivement à l'[annexe 5A](#) et l'[annexe 5B](#).

Vitellogénine (VTG)

41. Un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère / la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé ou par ponction cardiaque avec une seringue. Selon la taille du poisson, les volumes sanguins prélevés sont généralement de 5 à 60 µl par individu pour les têtes-de-boule et de 5 à 15 µl par individu pour les poissons-zèbres. Le plasma est séparé du sang par centrifugation avant d'être stocké avec des inhibiteurs de protéase à -80°C jusqu'à son analyse pour le dosage de la vitellogénine. Chez le medaka, un prélèvement hépatique est utilisé; chez le poisson-zèbre, un homogénat tête/queue peut être utilisé comme échantillon tissulaire pour le dosage de la vitellogénine ([annexe 6](#)). Le dosage de la VTG est effectué à l'aide d'une méthode ELISA homologue validée en utilisant des anticorps homologues et un standard de VTG homologue. Il est recommandé d'utiliser une méthode capable de détecter des concentrations de VTG de quelques ng/ml de plasma (ou ng/mg de tissus) seulement, correspondant à la concentration de fond chez les poissons mâles non exposés.

42. Le contrôle qualité de l'analyse de la vitellogénine se fait par le biais de solutions-étalons, de blancs et, au minimum, d'analyses dédoublées. Pour chaque méthode ELISA, l'effet de matrice (effet de la dilution de l'échantillon) est testé afin de déterminer le facteur de dilution minimale de l'échantillon. Chaque plaque ELISA utilisée pour le dosage de la VTG comporte les échantillons de contrôle qualité suivants : au moins six solutions-étalons couvrant la plage des concentrations attendues de vitellogénine, et

au moins un blanc d'essai de liaison non spécifique (en analyse dédoublée). L'absorbance de ces blancs est inférieure à 5 % de l'absorbance maximale des solutions-étalons. Au moins deux aliquotes (puits dédoublés) de chaque dilution de l'échantillon sont analysés. Les puits dédoublés qui diffèrent de plus de 20 % font l'objet d'une nouvelle analyse.

43. Le coefficient de corrélation (R^2) des courbes d'étalonnage est supérieur à 0.99. Toutefois une corrélation élevée ne suffit pas à garantir la prédiction adéquate de la concentration pour toutes les plages de concentration. En plus d'obtenir une corrélation suffisamment élevée pour la courbe d'étalonnage, la concentration de chaque solution-étalon, calculée à partir de la courbe d'étalonnage, est comprise entre 70 et 120 % de sa concentration nominale. Si les concentrations nominales ont tendance à s'éloigner de la droite de régression de l'étalonnage (à des concentrations plus faibles, par exemple), il peut s'avérer nécessaire de partager la courbe d'étalonnage en deux plages, l'une forte et l'autre faible, ou d'utiliser un modèle non linéaire pour ajuster correctement les données relatives à l'absorbance. Si la courbe est partagée, les deux segments de droite doivent avoir un coefficient de corrélation $R^2 > 0.99$.

44. La limite de détection (LDD) est définie comme la limite en deçà de laquelle la concentration est trop faible pour que la substance soit détectée, et la limite de quantification (LDQ) est définie comme la limite en deçà de laquelle la concentration est trop faible pour que la substance soit détectée, multipliée par le facteur de dilution le plus faible.

45. Chaque jour où des essais portant sur la vitellogénine sont réalisés, un échantillon fortifié obtenu à partir d'un étalon de référence inter-essais sera analysé (annexe 7). On notera alors systématiquement le rapport entre la concentration attendue et la concentration mesurée avec les résultats de chaque série d'essais effectués ce jour-là.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Évaluation de la réponse des biomarqueurs par l'analyse de la variance (ANOVA)

46. Pour identifier les effets potentiels d'une substance sur le système endocrinien, on compare les réponses des groupes traités et des groupes témoins en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA). Si un témoin contenant un solvant est utilisé, une analyse statistique appropriée du témoin contenant l'eau de dilution et du témoin contenant le solvant est effectuée pour chaque effet observé. On trouvera dans OCDE (2006c) (27) des orientations sur le traitement des données relatives au témoin contenant l'eau de dilution et au témoin contenant le solvant lors de l'analyse statistique ultérieure. Les réponses biologiques obtenues sont analysées et notées séparément pour chaque sexe. Si les hypothèses requises concernant les méthodes paramétriques ne se vérifient pas - distribution non normale (par exemple test de Shapiro-Wilk) ou variance hétérogène (test de Bartlett ou de Levene) - il faudra envisager de transformer les données pour homogénéiser les variances avant de réaliser l'ANOVA ou de conduire une analyse pondérée de la variance. Le test de Dunnett (paramétrique) permettant de multiples comparaisons par paires ou le test de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni (non paramétrique) peuvent être utilisés pour une relation dose-réponse non monotone. D'autres tests statistiques peuvent être utilisés (test de Jonckheere-Terpstra ou de Williams) si la relation dose-réponse est approximativement monotone. Un ordinogramme d'analyse statistique figure à l'annexe 8. Cet outil d'aide à la décision permet de choisir le test statistique le plus approprié. Le document de l'OCDE sur les méthodes actuelles d'analyse statistique des données d'écotoxicité (27) fournit d'autres informations en la matière.

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

Installation d'essai :

- Personnel chargé de l'étude et responsabilités de chacun;
- Chaque laboratoire a démontré sa compétence sur une gamme de substances chimiques représentatives;

Substance d'essai :

- Caractérisation de la substance d'essai;
- Nature physique et propriétés physico-chimiques pertinentes;
- Méthode et fréquence de préparation des concentrations d'essai;
- Informations sur la stabilité et la biodégradabilité;

Solvant :

- Caractérisation du solvant (nature, concentration utilisée);
- Justification du choix du solvant (si autre que l'eau);

Animaux d'expérience :

- Espèce et souche;
- Fournisseur et équipements particuliers du fournisseur;
- Âge des poissons au début de l'essai et état reproducteur ;
- Informations détaillées sur la procédure d'acclimatation des animaux;
- Poids corporel des poissons au début de l'exposition (déterminé à partir d'un sous-échantillon issu de la population de poissons);

Conditions de l'essai:

- Méthode utilisée (type d'essai, taux de charge, densité de peuplement, etc.);
- Méthode de préparation des solutions mères et débit;
- Concentrations d'essai nominales, dosage hebdomadaire de la concentration des solutions d'essai et méthode analytique utilisée, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les cuves d'essai et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations de la substance d'essai en solution vraie;
- Caractéristiques de l'eau de dilution (pH, dureté, alcalinité, température, concentration d'oxygène dissous, teneurs résiduelles en chlore, carbone organique total, solides en suspension et toute autre mesure effectuée);
- Qualité de l'eau dans les cuves d'essai : pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous;
- Informations détaillées sur l'alimentation (par exemple type d'aliments, provenance, quantité donnée et fréquence) et analyse des contaminants pertinents (PCB, HAP et pesticides organochlorés, par exemple);

Résultats

- Données montrant que les témoins remplissent les critères de validité de l'essai;
- Données sur la mortalité pour chaque concentration d'essai et chaque témoin;
- Techniques d'analyse statistique appliquées, traitement des données et justification des méthodes utilisées;

- Données sur les observations biologiques de morphologie macroscopique, y compris les caractères sexuels secondaires, la fécondité et la vitellogénine;
- Résultats des analyses de données, de préférence sous forme de tableaux et de graphiques;
- Fréquence des réactions inhabituelles des poissons et des effets visibles produits par la substance d'essai.

ORIENTATIONS POUR L'INTERPRÉTATION ET L'ACCEPTATION DES RÉSULTATS DE L'ESSAI

48. Cette partie traite des paramètres à prendre en compte pour l'interprétation des résultats de l'essai en ce qui concerne les différents effets mesurés. Les résultats sont interprétés avec prudence lorsque la substance d'essai semble provoquer des signes de toxicité manifestes ou avoir des effets sur l'état général de l'animal d'expérience.

49. Lors de l'essai préliminaire de détermination des concentrations d'essai, on veillera à ne pas dépasser la concentration maximale tolérée pour pouvoir interpréter les données de façon fiable. Il importe d'appliquer au moins un traitement qui ne provoque aucun signe d'effets toxiques. Les symptômes de maladie et les signes d'effets toxiques font l'objet d'une évaluation et d'un rapport détaillés. Il est possible, par exemple, que la production de VTG chez les femelles soit également affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non liés au système endocrinien (hépatotoxicité, par exemple). Toutefois l'interprétation des effets peut être renforcée par d'autres niveaux de traitement dont les effets ne sont pas perturbés par la toxicité systémique.

50. Quelques paramètres sont pris en compte pour l'acceptation des résultats de l'essai. A titre indicatif, les niveaux de VTG sont distincts chez les mâles et les femelles témoins, et séparés d'au moins trois ordres de grandeur chez le tête-de-boule et le poisson-zèbre et d'un ordre de grandeur chez le medaka. Des exemples de la gamme des valeurs relevées dans les groupes témoins et les groupes traités sont disponibles dans les rapports de validation (1, 2, 3, 4). Des valeurs élevées de VTG chez les mâles des groupes témoins peuvent compromettre la performance de l'essai et sa capacité de détection des agonistes des œstrogènes de faible puissance. Des valeurs de VTG basses chez les femelles témoins peuvent compromettre la performance de l'essai et sa capacité de détection des inhibiteurs de l'aromatase et des antagonistes des œstrogènes. Les études de validation ont été utilisées pour la rédaction de ces orientations.

51. Si un laboratoire n'a pas procédé à cet essai auparavant ou s'il a procédé à des modifications substantielles (changement de souche ou de fournisseur de poissons, par exemple), il est conseillé de faire un essai pour vérifier la compétence technique. Il est recommandé d'utiliser des substances représentant une gamme de modes d'action ou d'impacts sur certains des paramètres mesurés durant l'essai. En pratique, chaque laboratoire est encouragé à constituer ses propres données de contrôle historiques pour les mâles et les femelles, et à faire un essai avec un témoin positif de l'activité œstrogénique (par exemple, 17β -œstradiol à 100 ng/l, ou un agoniste faible connu) engendrant une augmentation de la VTG chez les mâles, un témoin positif de l'inhibition de l'aromatase (fadrozole ou prochloraz à 300 µg/l, par exemple) engendrant une diminution de la VTG chez les femelles, et un témoin positif de l'activité androgénique (17β -trenbolone à 5 µg/l, par exemple) engendrant l'induction de caractères sexuels secondaires chez les femelles tête-de-boule et medaka. Toutes ces données peuvent être comparées aux données disponibles issues des études de validation (1, 2, 3) pour garantir la compétence du laboratoire.

52. En général, les mesures de la vitellogénine sont considérées comme positives en cas d'augmentation statistiquement significative de la VTG chez les mâles ($p < 0.05$) ou de baisse statistiquement significative chez les femelles ($p < 0.05$), et ce au moins à la concentration maximale soumise à l'essai par rapport au groupe témoin, et en l'absence de signes de toxicité générale. Un résultat

positif est en outre confirmé par la démonstration d'une relation dose-réponse biologiquement plausible. Comme mentionné précédemment, la baisse de la vitellogénine peut ne pas être entièrement liée au système endocrinien; toutefois un résultat positif est en général interprété comme un élément de preuve d'une activité du système endocrinien *in vivo*, et motive normalement des actions visant à une clarification plus poussée.

LITERATURE

1. OCDE (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et l'évaluation, n° 60, ENV/JM/MONO(2006)27.
2. OCDE (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et l'évaluation, n° 61, ENV/JM/MONO(2006)29.
3. OCDE (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et l'évaluation, n° 78, ENV/JM/MONO(2007)25.
4. Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (consulté le 18/09/08).
5. US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Rapport non publié daté du 15 décembre 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.
6. OCDE, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et l'évaluation, n° 94, ENV/JM/MONO(2008)21.
7. Sumpter et Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*;103 Suppl 7:173-8 Review.
8. Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
9. Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
10. Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*;67(1):121-30.
11. Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.

12. Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.
13. Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bruxelles, Belgique.
14. Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
15. Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131
16. Rose J, Holbech H, Lindholm C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C*. 131: 531-539.
17. Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
18. Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
19. Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
20. Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.
21. Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
22. OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. - Série sur les essais et l'évaluation, n° 23, ENV/JM/MONO(200)6.
23. Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. *Aquatic Toxicology*, 76 ; pp.69-92.

24. Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as "signposts," not "traffic lights," in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*;114 Suppl 1:106-14.
25. Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
26. Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve et G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
27. OCDE (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement - Série sur les essais et l'évaluation, n° 54. ENV/JM/MONO(2006)18.

ANNEXE 1ABRÉVIATIONS & DÉFINITIONS

CV : coefficient de variation

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) : procédé immunochimique d'absorption enzymatique

Taux de charge : poids frais de poissons par unité de volume d'eau

Densité de peuplement : nombre de poissons par unité de volume d'eau

Vitellogénine (VTG) : lipo-glyco-phospho-protéine précurseur des protéines du vitellus normalement produite par les femelles sexuellement actives de toutes les espèces ovipares

Axe HHG : axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

CMT : concentration maximale tolérée représentant environ 10 % de la CL₅₀

ANNEXE 2CONDITIONS EXPÉRIMENTALES DU PROTOCOLE DE DÉPISTAGE DES SUBSTANCES AGISSANT SUR LE SYSTÈME ENDOCRINIEN DES POISSONS NON REPRODUCTEURS

| 1. Espèces recommandées | Tête-de-boule (<i>Pimephales promelas</i>) | Medaka (<i>Oryzias latipes</i>) | Poisson-zèbre (<i>Danio rerio</i>) |
|---|--|--|--|
| 2. Type d'essai | dynamique | dynamique | dynamique |
| 3. Température de l'eau | 25 ± 2°C | 25± 2°C | 26 ± 2°C |
| 4. Qualité de l'éclairage | Ampoules fluorescentes (à large spectre) | Ampoules fluorescentes (à large spectre) | Ampoules fluorescentes (à large spectre) |
| 5. Intensité de l'éclairage | 10-20 µE/m ² /s, 540- 1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire) | 10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire) | 10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire) |
| 6. Photopériode (transitions – aube et crépuscule - optionnelles, mais non considérées comme nécessaires) | 16 h de lumière, 8 h d'obscurité | 12-16 h de lumière, 12-8 h d'obscurité | 12-16 h de lumière, 12-8 h d'obscurité |
| 7. Taux de charge | <5 g/l | <5 g/l | <5 g/l |
| 8. Volume des enceintes d'essai | 10 l (minimum) | 2 l (minimum) | 5 l (minimum) |
| 9. Volume de la solution d'essai | 8 l (minimum) | 1.5 l (minimum) | 4 l (minimum) |
| 10. Remplacement volumique des solutions d'essai | Minimum 6 fois/jour | Minimum 5fois/jour | Minimum 5fois/jour |
| 11. Âge des organismes d'essai | voir § 20 | voir § 20 | voir § 20 |
| 12. Poids frais approximatif des poissons adultes (g) | femelles: 1.5 ± 20 % mâles: 2.5 ± 20 % | femelles: 0.35 ± 20 % mâles: 0.35 ± 20 % | femelles: 0.65 ± 20 % mâles: 0.4 ± 20 % |
| 13. Nombre de poissons par cuve | 6 (2 mâles et 4 femelles) | 10 (5 mâles and 5 femelles) | 10 (5 mâles and 5 femelles) |
| 14. Nombre de traitements | = 3 (plus témoins appropriés) | = 3 (plus témoins appropriés) | = 3 (plus témoins appropriés) |

ANNEXE 2 (suite)

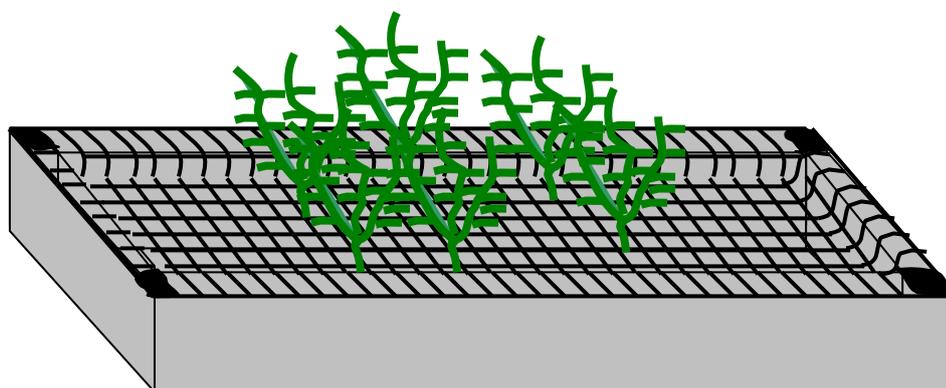
| | | | |
|--|--|--|--|
| 15. Nombre de cuves par traitement | 4 minimum | 2 minimum | 2 minimum |
| 16. Nombre de poissons par concentration d'essai | 16 adultes femelles et 8 mâles (4 femelles et 2 mâles dans chaque répliquat) | 10 adultes femelles et 10 mâles (5 femelles et 5 mâles dans chaque répliquat) | 10 adultes femelles et 10 mâles (5 femelles et 5 mâles dans chaque répliquat) |
| 17. Régime alimentaire | Artémies adultes ou nauplies d'artémies, vivantes ou congelées, deux ou trois fois par jour (<i>ad libitum</i>), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments | Nauplies d'artémies deux ou trois fois par jour (<i>ad libitum</i>), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments | Nauplies d'artémies deux ou trois fois par jour (<i>ad libitum</i>), nourriture disponible dans le commerce ou combinaison de ces éléments |
| 18. Aération | Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA) | Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA) | Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air (VSA) |
| 19. Eau de dilution | Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée | Eau de surface, de puits ou reconstituée, ou eau du robinet déchlorée | Eau de surface, de puits ou reconstituée ou eau du robinet déchlorée |
| 20. Période de pré-exposition | 7 jours (recommandé) | 7 jours (recommandé) | 7 jours (recommandé) |
| 21. Durée de l'exposition au produit chimique | 21 jours | 21 jours | 21 jours |
| 22. Effets biologiques mesurés | - survie - comportement - caract. sexuels secondaires - VTG | - survie - comportement - caract. sexuels secondaires - VTG | - survie - comportement - VTG |
| 23. Critères de validité de l'essai | Concentration d'oxygène dissous ≥ 60 % de la VSA; température moyenne de $25 \pm 2^\circ\text{C}$; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement | Concentration d'oxygène dissous ≥ 60 % de la VSA; température moyenne de $24 \pm 2^\circ\text{C}$; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement | Concentration d'oxygène dissous ≥ 60 % de la VSA; température moyenne de $26 \pm 2^\circ\text{C}$; 90 % de survie dans les groupes témoins; concentration mesurée de la substance d'essai maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées pour chaque niveau de traitement |

ANNEXE 3QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

| SUBSTANCE | CONCENTRATIONS |
|---|----------------|
| Matières particulaires | < 20 mg/l |
| Carbone organique total | < 2 mg/l |
| Ammoniac non ionisé | < 1 µg/l |
| Chlore résiduel | < 10 µg/l |
| Pesticides organophosphorés totaux | < 50 ng/l |
| Pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés | < 50 ng/l |
| Chlore organique total | < 25 ng/l |

ANNEXE 4ASUBSTRAT DE FRAI POUR LES POISSONS-ZÈBRES

Plateau de frai : plat à instruments en verre, mesurant par exemple 22x15x5.5 cm (L x l x h), recouvert d'une grille amovible en acier inoxydable (mailles de 2 mm de largeur). La base de cette grille se trouve plus bas que le bord du plat à instruments.



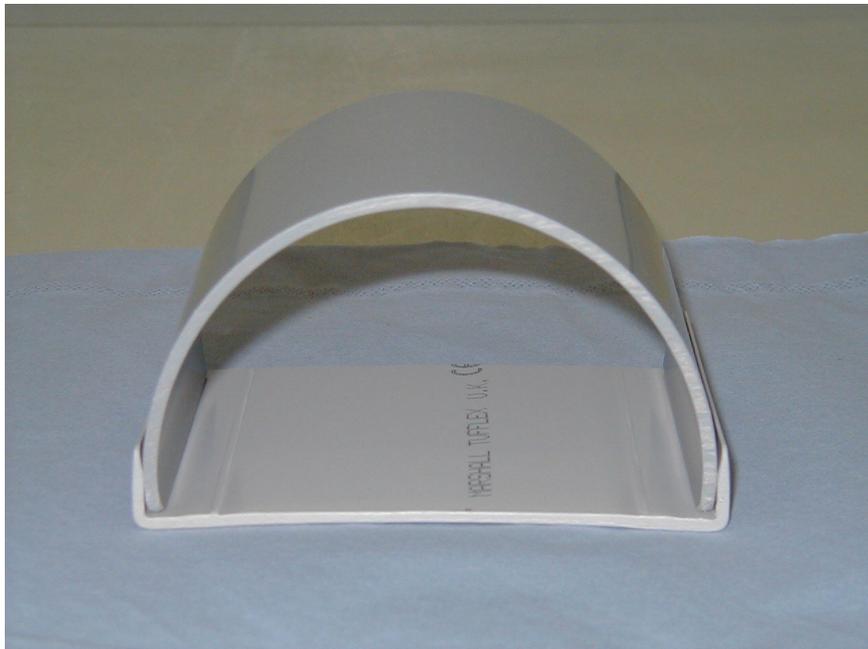
Le substrat de frai est fixé sur la grille. Il forme une structure dans laquelle les poissons peuvent pénétrer. Des plantes d'aquarium artificielles en plastique vert, par exemple, peuvent convenir (NB : l'adsorption possible de la substance d'essai sur la matière plastique est prise en compte). Le plastique est lessivé dans un volume suffisant d'eau chaude et pendant un temps suffisant pour qu'aucune substance ne risque de se retrouver dans la solution d'essai. Si des objets en verre sont utilisés, on veille à ce que les poissons ne soient ni blessés ni entravés lors de mouvements vigoureux.

La distance entre le plateau et les parois de la cuve est d'au moins 3 cm pour que le frai ne se fasse pas à l'extérieur du plateau. Les œufs déposés sur le plateau traversent la grille et peuvent être prélevés 45 à 60 minutes après le début de l'éclairage. Les œufs translucides n'adhèrent pas et peuvent facilement être comptés grâce une lumière transversale. Pour cinq femelles par cuve, le nombre d'œufs pondus peut être considéré comme faible s'il est inférieur ou égal à 20 par jour, moyen s'il est compris entre 20 et 100, et élevé s'il est supérieur à 100. Le plateau de frai est retiré, les œufs ramassés et le plateau de frai réintroduit dans la cuve d'essai, le plus tard possible dans la soirée ou bien très tôt le matin. La réintroduction du plateau se fait dans un délai maximum d'une heure car sinon le signal du substrat de frai peut induire un accouplement et un frai à un moment inhabituel. Si la situation nécessite une introduction ultérieure du plateau de frai, il faut attendre au moins neuf heures après le début de l'éclairage. A cette heure tardive de la journée, l'induction de frai ne se fait plus.

ANNEXE 4BSUBSTRAT DE FRAI POUR LES TÊTES-DE-BOULE

Deux ou trois plaques et plateaux de frai en plastique/céramique/verre ou en acier inoxydable combinés sont placés dans chaque enceinte d'essai (morceau de gouttière semi-circulaire grise de 80 mm de longueur posé sur un plateau à rebords de 130 mm de long, par exemple) (voir photo). Il est avéré que les plaques en PVC ou en céramique vieilles pouvaient convenablement servir de substrat de frai (Thorpe *et al*, 2007).

Il est recommandé d'utiliser des plaques abrasées pour améliorer l'adhérence. Le plateau est aussi muni d'un écran de protection empêchant les poissons d'accéder aux œufs tombés, à moins que l'efficacité de l'adhérence des œufs ait été démontrée pour le substrat de frai utilisé.



Le socle est conçu pour contenir tous les œufs qui n'adhèrent pas à la surface des plaques et tomberaient donc au fond de l'enceinte (ou les œufs déposés directement sur le socle en plastique plat). Tous les substrats de frai sont lessivés pendant au moins 12 heures dans l'eau de dilution avant leur utilisation.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

ANNEXE 5AÉVALUATION DES CARACTÈRES SEXUELS SECONDAIRES DU TÊTE-DE-BOULE POUR LA DÉTECTION DE CERTAINS PERTURBATEURS ENDOCRINIENS*Synthèse*

Chez les têtes-de-boule adultes, les caractéristiques physiques pouvant avoir de l'importance dans les essais de perturbateurs endocriniens sont les suivantes : couleur (claire/sombre), motifs de coloration (présence ou absence de bandes verticales), forme du corps (région de la tête et région pectorale, distension de l'abdomen) et caractères sexuels secondaires spécifiques de l'espèce (nombre et taille des tubercules nuptiaux, taille du bourrelet dorsal et ovipositeur).

Les tubercules nuptiaux sont situés sur la tête (bourrelet dorsal) des têtes-de-boule adultes mâles reproducteurs, et sont généralement disposés bilatéralement et symétriquement (Jensen *et al.* 2001). Les femelles et les juvéniles mâles et femelles des cuves témoins ne développent pas de tubercule (Jensen *et al.* 2001). Il est possible de dénombrer jusqu'à huit tubercules individuels autour des yeux et entre les narines des mâles. Les tubercules les plus importants en nombre et en taille forment deux lignes parallèles situées juste en dessous des narines et au-dessus de la bouche. De nombreux poissons possèdent des groupes de tubercules sous la mâchoire inférieure ; tout près de la bouche on en trouve généralement une seule paire alors que le ventre peut comprendre jusqu'à quatre tubercules. Le nombre de tubercules dépasse rarement 30 (fourchette, 18-28 ; Jensen *et al.* 2001). Les tubercules les plus nombreux forment une seule et même structure de forme plutôt arrondie, dont la hauteur est à peu près égale au rayon. Chez la plupart des mâles reproducteurs, certains tubercules sont si étendus et protubérants qu'il est impossible de les distinguer les uns des autres.

Certains types de perturbateurs endocriniens peuvent provoquer l'apparition anormale de caractères sexuels secondaires chez le sexe opposé ; ainsi, les agonistes des récepteurs d'androgènes tels que la 17 β -méthyltestostérone ou le 17 β -trenbolone peuvent provoquer l'apparition de tubercules nuptiaux chez le tête-de-boule femelle (Smith, 1974 ; Ankley *et al.*, 2001, 2003), tandis que les agonistes des récepteurs d'œstrogènes peuvent réduire le nombre ou la taille des tubercules nuptiaux chez les mâles (Miles-Richardson *et al.*, 1999 ; Harries *et al.*, 2000).

On trouvera ci-après une description de la caractérisation des tubercules nuptiaux chez les têtes-de-boule, fondée sur le mode opératoire utilisé par le laboratoire de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) à Duluth, Minnesota. Les produits et/ou équipements spécifiques peuvent être remplacés par des matériaux comparables disponibles.

L'utilisation d'une loupe à éclairage ou d'un microscope binoculaire de dissection à éclairage (3X) permet une observation optimale. On observera le poisson en position dorsale, partie antérieure vers l'avant (tête vers l'observateur).

a. Placer le poisson dans une petite boîte de Pétri (100 mm de diamètre, par exemple), sur le dos, partie antérieure vers l'avant. Régler le viseur pour pouvoir identifier les tubercules. Faire rouler doucement le poisson d'un côté puis de l'autre pour identifier les zones où se trouvent les tubercules. Compter et classer les tubercules.

b. Renouveler l'observation sur la partie ventrale antérieure après avoir placé le poisson sur le dos, partie antérieure vers l'avant, dans la boîte de Pétri.

c. Les observations ne prennent pas plus de 2 minutes par poisson.

Dénombrement et classement des tubercules

Six zones spécifiques ont été identifiées pour l'évaluation de la présence et du développement de tubercules chez les têtes-de-boule adultes. Une matrice a été créée pour cartographier la localisation des tubercules et la quantité de tubercules présents (voir Appendice 1, page 26). Le nombre de tubercules est consigné, et les tubercules peuvent être classés comme suit en fonction de leur taille : 0-absence, 1-présent, 2-agrandi et 3-protubérant pour chaque organisme (Photo 1).

Classe 0-absence de tout tubercule. Classe 1-tubercule présent, identifié comme tout tubercule dont un seul point est de hauteur presque égale à son rayon (diamètre). Classe 2-tubercule agrandi, identifié par des tissus ressemblant à un astérisque, présentant généralement une large base radiale marquée de stries et de sillons partant du centre. La hauteur des tubercules est souvent plus irrégulière mais peut parfois être un peu arrondie. Classe 3-tubercule protubérant, de forme généralement plutôt large et arrondie et de structure moins bien définie. Ce tubercules s'agglomèrent parfois pour former une seule et même masse le long d'une zone ou de plusieurs zones (B, C et D, voir description ci-dessous). Leur couleur et leur forme sont similaires à celles de la classe 2, mais sont parfois assez indéterminées. Ce système de classement permet généralement d'obtenir un résultat global < 50 chez un mâle témoin normal possédant un nombre de tubercules compris entre 18 et 20 (Jensen *et al.* 2001).



Photo 1

Certains poissons peuvent présenter plus de tubercules que la matrice ne compte de cases (voir appendice 1) pour une zone particulière. Dans ce cas, des chiffres supplémentaires peuvent être indiqués à l'intérieur, à droite ou à gauche de la case. La matrice n'a donc pas besoin d'afficher une symétrie. Une autre technique permettant de cartographier les tubercules allant par paires ou réunis verticalement le long du plan horizontal de la bouche pourrait consister à indiquer deux chiffres dans une seule case.

Zones cartographiées :

A - Tubercules situés autour des yeux. Localisés de dorsal à ventral autour du bord antérieur des yeux. Couramment multiples chez les mâles témoins mûrs, absents chez les femelles témoins, généralement par paires (un près de chaque œil) ou uniques chez les femelles exposées à des androgènes.

B - Tubercules situés entre les narines (pores-canaux sensoriels). Normalement par paires chez les mâles témoins à des niveaux de développement supérieurs (2-agrandi ou 3-protubérants). Absents chez les femelles témoins mais parfois présents chez les femelles exposées à des androgènes.

C - Tubercules situés immédiatement devant les narines, parallèlement à la bouche. Généralement agrandis ou protubérants chez les mâles témoins mûrs. Présents ou agrandis chez les mâles moins développés ou chez les femelles exposées à des androgènes.

D - Tubercules situés parallèlement à la bouche. Généralement classés « développés » chez les mâles témoins. Absents chez les femelles témoins mais présents chez les femelles exposées à des androgènes.

E - Tubercules situés sur la mâchoire inférieure, près de la bouche, généralement petits et par paires. Variables chez les mâles témoins ou traités et chez les femelles traitées.

F - Tubercules situés sous la zone E. Généralement petits et par paires. Présents chez les mâles témoins et chez les femelles exposées à des androgènes.

Références

1. Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
2. Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
3. Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
4. Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
5. Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
6. Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17 α -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
7. Smith RJF. 1974. Effects of 17 α -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Appendice 1

Matrice pour la cartographie des tubercules

Classification numérique

N° ident. _____
 Date _____
 Score total _____

1-présent
 2-agrandi
 3-protubérant

| | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|
| | A | X1 | X1 | X1 | X1 |
|--|---|----|----|----|----|

| | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|
| | B | X1 | X1 | X1 | X1 |
|--|---|----|----|----|----|

| | | | | | | | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | C | X1 |
| | D | X1 |

| | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|
| | E | X1 | X1 | | |
| | F | X1 | X1 | X1 | X1 |

Matrice pour la cartographie des tubercules

Classification numérique

N° ident. _____
 Date _____
 Score total _____

1-présent
 2-agrandi
 3-protubérant

| | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|
| | A | X1 | X1 | X1 | X1 |
|--|---|----|----|----|----|

| | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|
| | B | X1 | X1 | X1 | X1 |
|--|---|----|----|----|----|

| | | | | | | | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | C | X1 |
| | D | X1 |

| | | | | | |
|--|---|----|----|----|----|
| | E | X1 | X1 | | |
| | F | X1 | X1 | X1 | X1 |

ANNEXE 5B**ÉVALUATION DES CARACTÈRES SEXUELS SECONDAIRES DU MEDAKA
POUR LA DÉTECTION DE CERTAINS PERTURBATEURS ENDOCRINIENS**

La mesure des tubercules papillaires*, qui sont les caractères sexuels secondaires du medaka (*Oryzias latipes*) est décrite ci-après.

* Les tubercules papillaires sont normalement présents uniquement chez les mâles adultes, et se situent entre le deuxième et le septième ou le huitième rayon de nageoire en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale (fig.1 et 2). Ils apparaissent rarement sur le premier rayon en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale. Cette procédure opératoire standard (POS) permet de mesurer les tubercules présents sur le premier rayon de nageoire (le numéro du rayon est déterminé en comptant à partir de l'extrémité postérieure de la nageoire anale dans cette POS).

- (1) Après excision du foie (annexe 6), la carcasse est placée dans un tube conique contenant 10 ml environ de formol tamponné à 10 % (tête en haut, queue en bas). Si la gonade est fixée dans une autre solution que du formol tamponné à 10 %, pratiquer à l'aide d'un rasoir une incision transversale dans la carcasse entre la région antérieure de la nageoire anale et l'anus, en prenant soin de ne pas abîmer le gonopore et la gonade (fig.3). Placer la partie tête du corps du poisson dans la solution de fixation pour préserver la gonade, et la partie queue dans du formol tamponné à 10 % tel que décrit ci-dessus.
- (2) Après avoir placé le poisson dans du formol tamponné à 10 %, saisir la région antérieure de la nageoire anale avec des pincettes et la plier pendant une trentaine de secondes pour que la nageoire anale reste ouverte. En prenant la nageoire anale avec les pincettes, saisir quelques rayons de nageoire dans la région antérieure en prenant soin de ne pas abîmer les tubercules papillaires.
- (3) Après avoir maintenu la nageoire anale ouverte pendant une trentaine de secondes, placer le poisson dans du formol tamponné à 10 % à température ambiante jusqu'à la mesure des tubercules papillaires (cette mesure est effectuée au bout de 24 heures minimum).

Mesure

- (1) Après avoir fixé le poisson dans le formol tamponné à 10 % pendant au moins 24 heures, retirer la carcasse du tube conique et essuyer le formol avec du papier filtre (ou essuie-tout).
- (2) Placer le poisson abdomen vers le haut. Découper ensuite soigneusement la nageoire anale avec de petits ciseaux à dissection (il est préférable de découper la nageoire anale avec un peu de rayon endosquelettique).
- (3) Saisir la région antérieure de la nageoire anale excisée avec des pincettes et la poser sur une lame de verre avec quelques gouttes d'eau. Couvrir ensuite la nageoire anale avec une lamelle couvre-objet. Prendre soin de ne pas abîmer les tubercules papillaires en prenant la nageoire anale avec les pincettes.
- (4) Noter le nombre de plaques conjointes présentant des tubercules papillaires à l'aide du compteur placé sous un microscope biologique (microscope droit ou microscope inversé). On reconnaît les tubercules papillaires à la petite formation de tubercules visible sur le côté postérieur des plaques conjointes. Inscrive sur la feuille de travail le nombre de plaques conjointes présentant des tubercules papillaires pour chaque rayon de nageoire (premier rayon : 0, deuxième rayon : 10, troisième rayon : 12, etc.) puis inscrire leur somme sur la feuille Excel pour chaque poisson. Si nécessaire, photographier la nageoire anale et noter le nombre de plaques conjointes présentant des tubercules papillaires sur la photo.
- (5) Après la mesure, placer la nageoire anale dans le tube conique décrit en (1) et le stocker.

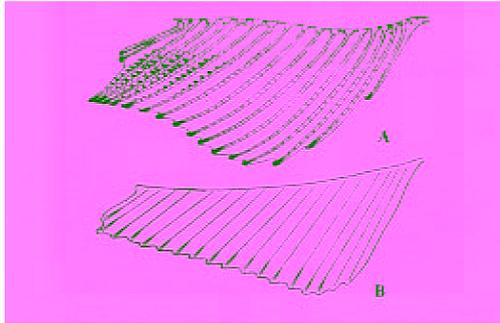


Fig.1. Schéma illustrant la différence de forme et de taille de la nageoire anale entre les sexes. A, mâle ; B, femelle. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci.*, Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

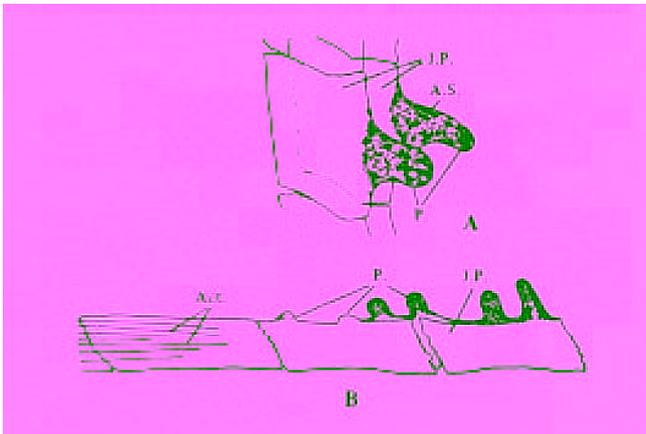


Fig.2. A, Tubercules papillaires situés sur les plaques conjointes de la nageoire anale. J.P., plaque conjointe ; A.S., espace axial ; P., tubercule. B, Extrémité distale de la nageoire anale. Les actinotriches (Act.) sont situés à l'extrémité. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. *J. Fac. Sci.*, Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

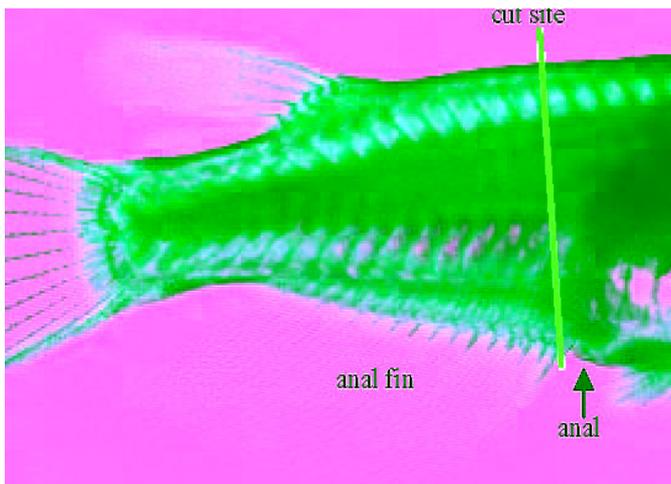


Fig.3. Photographie montrant le site de coupe lorsque la gonade est fixée dans une autre solution que du formol tamponné à 10 %. Dans ce cas, le corps restant sera coupé entre la région antérieure de la nageoire anale et l'anus à l'aide d'un rasoir (trait rouge). La tête sera placée dans la solution de fixation pour préserver la gonade, et la queue dans le formol tamponné à 10 %.

ANNEXE 6PROCÉDURES RECOMMANDÉES POUR LES PRÉLÈVEMENTS EFFECTUÉS
À DES FINS DE DOSAGE DE LA VITELLOGÉNINE

On prendra soin d'éviter la contamination croisée entre les échantillons de VTG des mâles et des femelles.

Procédure 1A : tête-de-boule, prélèvement sanguin dans l'artère / la veine caudale

Après anesthésie, le pédoncule caudal est partiellement sectionné avec une lame de scalpel, et un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère / la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé. Après le prélèvement sanguin, le plasma est rapidement séparé par centrifugation à température ambiante pendant 3 minutes à 15 000 g (ou bien à une température de 4°C pendant 10 minutes à 15 000 g). Le pourcentage d'hématocrite peut éventuellement être déterminé à l'issue de la centrifugation. Le plasma est ensuite retiré du tube à microhématocrite puis stocké dans un tube de centrifugeuse avec 0.13 unité d'aprotinine (un inhibiteur de protéase) à -80°C jusqu'au dosage de la vitellogénine. Selon la taille du tête-de-boule (qui dépend du sexe), les volumes de plasma pouvant être prélevés sont généralement de 5 à 60 µl par individu (Jensen *et al.* 2001).

Procédure 1B : tête-de-boule, prélèvement sanguin par ponction cardiaque

Il est également possible d'effectuer un prélèvement sanguin par ponction cardiaque effectuée à l'aide d'une seringue héparinisée (1 000 unités d'héparine par ml). Le sang est versé dans des tubes Eppendorf (maintenus dans de la glace) avant d'être centrifugé (5 minutes à 7 000 g à température ambiante). Le plasma est versé dans des tubes Eppendorf propres (dans des aliquotes si le volume de plasma le permet) puis rapidement congelé à -80°C jusqu'à l'analyse (Panter *et al.*, 1998).

Procédure 2A : Medaka japonais, excision du foie

Retrait des poissons d'essai de l'enceinte d'essai

- (1) Les poissons d'essai sont sortis de l'enceinte d'essai à l'aide d'une épuisette. Attention à ne pas laisser tomber les poissons dans une autre enceinte d'essai.
- (2) En principe, les poissons d'essai sont retirés dans l'ordre suivant : témoin, cuve témoin contenant le solvant (s'il y a lieu), concentration minimale, concentration moyenne, concentration maximale et témoin positif. De plus, tous les mâles sont retirés de l'enceinte d'essai avant les femelles.
- (3) Le sexe de chaque poisson d'essai est identifié à partir des caractères sexuels secondaires externes (forme de la nageoire anale, par exemple).
- (4) Placer les poissons dans un conteneur puis les transporter jusqu'au poste de travail pour l'excision du foie. Vérifier les étiquettes de l'enceinte d'essai et du conteneur de transport par souci de précision et pour confirmer que le nombre de poissons sortis de l'enceinte d'essai et le nombre de poissons restés dans l'enceinte d'essai sont compatibles avec les prévisions.

- (5) Si le sexe ne peut pas être identifié d'après l'apparence externe du poisson, sortir tous les poissons de l'enceinte d'essai. Dans ce cas, le sexe est identifié par observation de la gonade ou des caractères sexuels secondaires au stéréomicroscope.

Excision du foie

- (1) Transférer les poissons d'essai du conteneur de transport vers la solution anesthésique avec l'épuisette.
- (2) Après anesthésie, saisir les poissons d'essai avec des pincettes (de modèle courant) pour les déposer sur le papier filtre (ou essuie-tout). En saisissant les poissons, appliquer les pincettes sur les côtés de la tête pour éviter de casser la queue.
- (3) Essuyer l'eau de la surface des poissons d'essai avec le papier filtre (ou essuie-tout).
- (4) Placer les poissons sur le dos. Pratiquer ensuite une petite incision transversale entre la région ventre-nuque et le milieu de l'abdomen avec des ciseaux à dissection.
- (5) Introduire les ciseaux à dissection dans la petite incision, et inciser l'abdomen le long de sa ligne médiane, depuis un point caudal par rapport au manteau branchial jusqu'au côté crânien de l'anus. Attention à ne pas introduire les ciseaux à disséquer trop profondément pour ne pas abîmer le foie et la gonade.
- (6) Mener les opérations suivantes sous le stéréomicroscope.
- (7) Placer les poissons sur le dos sur l'essuie-tout (ou une boîte de Pétri en verre ou une lame de verre).
- (8) Ecarter les parois de la cavité abdominale avec les pincettes de précision puis extérioriser les organes internes. Il est également possible d'extérioriser les organes internes en retirant l'une des parois de la cavité abdominale si nécessaire.
- (9) Etaler la partie qui relie le foie et la vésicule biliaire à l'aide d'une autre paire de pincettes de précision. Saisir ensuite le canal biliaire et couper la vésicule biliaire. Veiller à ne pas rompre la vésicule biliaire.
- (10) Saisir l'œsophage et exciser les intestins du foie selon la même méthode. Veiller à ce que le contenu du tube digestif ne s'échappe pas. Exciser l'intestin caudal de l'anus et retirer le tractus de la cavité abdominale.
- (11) Retirer la masse de tissus gras et autres situés à la périphérie du foie. Prendre soin de ne pas abîmer le foie.
- (12) Saisir la zone de la porte hépatique avec les pincettes de précision et retirer le foie de la cavité abdominale.
- (13) Placer le foie sur la lame de verre. A l'aide des pincettes de précision, retirer les autres tissus gras et étrangers (paroi abdominale interne, par exemple), s'il y a lieu, de la surface du foie.

- (14) Peser le foie au moyen d'une balance de précision électronique, en utilisant comme tare un microtube de 1.5 ml. Consigner la valeur sur la feuille de travail (précision à 0.1 mg près). Confirmer les informations d'identification sur l'étiquette du microtube.
- (15) Fermer le capuchon du microtube contenant le foie. Stocker le microtube dans un bac de refroidissement (ou un bac de glace).
- (16) Après chaque excision de foie, nettoyer les instruments de dissection ou les remplacer par des instruments propres.
- (17) Retirer le foie de tous les poissons se trouvant dans les conteneurs de transport comme indiqué ci-dessus.
- (18) Après excision du foie de tous les poissons se trouvant dans le conteneur de transport (c'est-à-dire de tous les mâles et de toutes les femelles d'une enceinte d'essai), placer tous les spécimens hépatiques sur un support pour tubes muni d'une étiquette d'identification puis les stocker dans un congélateur. Lorsque les foies sont fournis pour pré-traitement peu de temps après leur excision, les spécimens sont transportés jusqu'au poste de travail le plus proche dans un bac de refroidissement (ou un bac de glace).

Après excision du foie, la carcasse est prête pour l'histologie gonadique et la mesure des caractères sexuels secondaires.

Spécimens

Stocker les spécimens hépatiques prélevés sur les poissons d'essai à une température ≤ -70 °C s'ils ne sont pas utilisés pour le pré-traitement juste après leur excision.

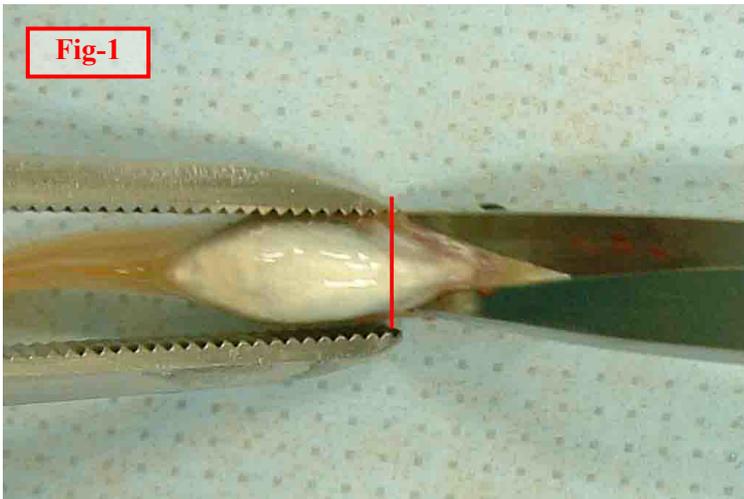


Fig-1

Fig-1

Une incision de la partie antérieure des nageoires pectorales est pratiquée avec des ciseaux.

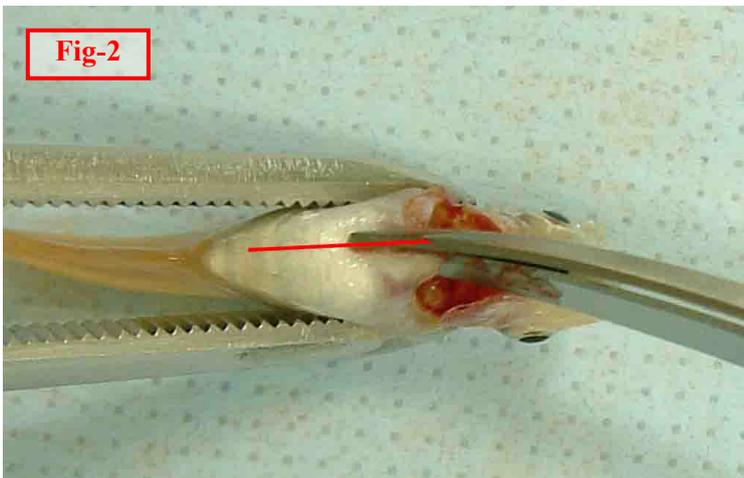


Fig-2

Fig-2

La ligne médiane de l'abdomen est incisée avec des ciseaux depuis un point situé à environ 2 mm du crâne jusqu'à l'anus.

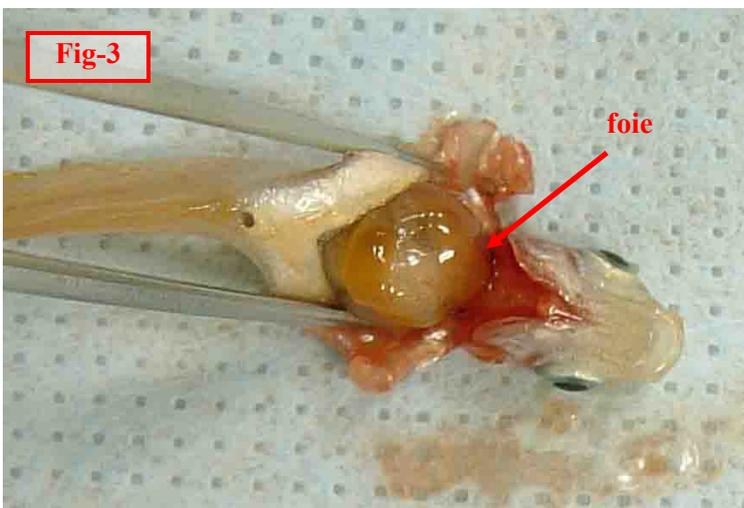
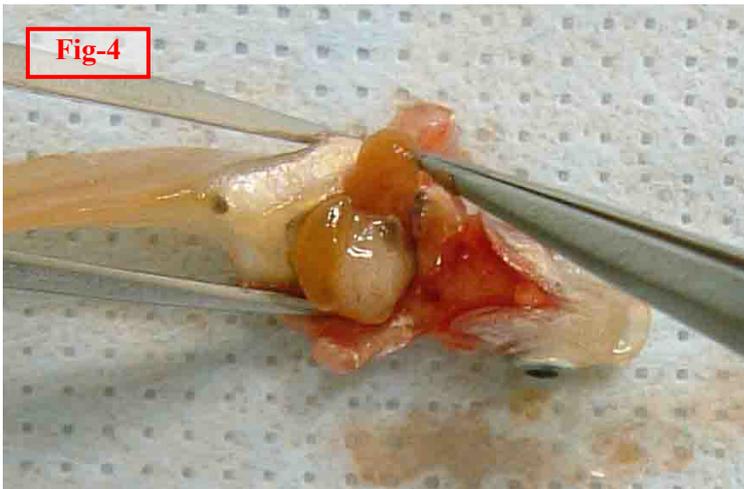


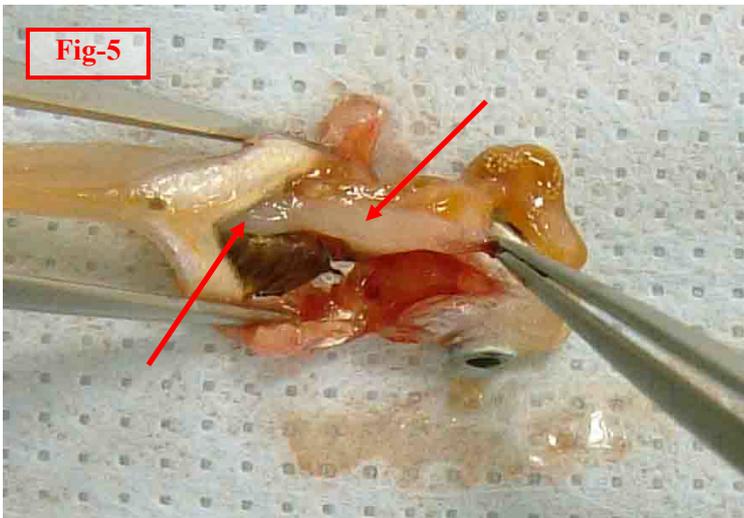
Fig-3

Fig-3

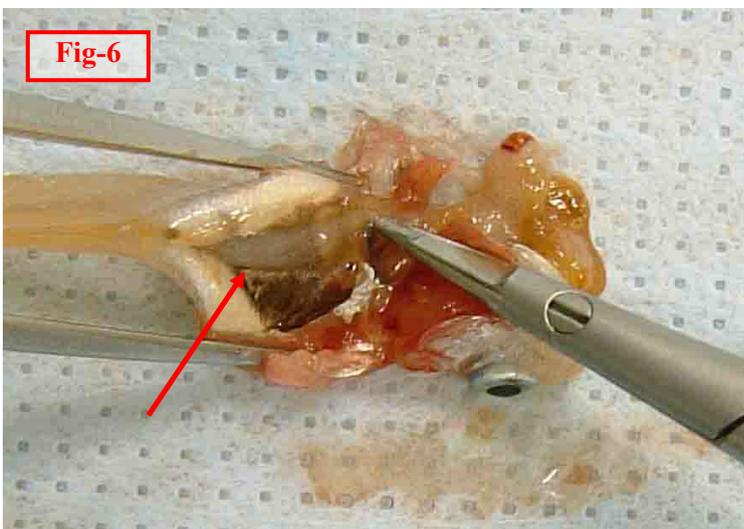
Les parois abdominales sont écartées avec des pincettes pour exposer le foie et les autres organes internes (elles peuvent aussi être épinglées latéralement).

**Fig-4****Fig-4**

Le foie est disséqué et excisé avec des pincettes.

**Fig-5****Fig-5**

Les intestins sont délicatement retirés avec des pincettes.

**Fig-6****Fig-6**

Les deux extrémités des intestins et les attaches du mésentère sont sectionnées avec des ciseaux.

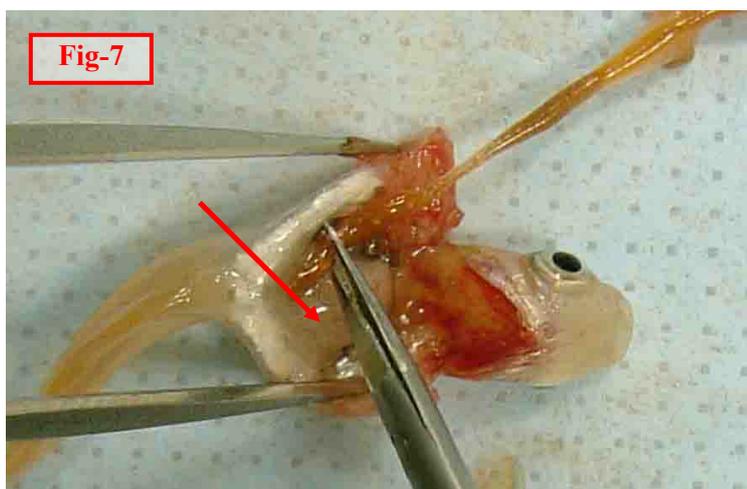


Fig-7

Fig-7 (femelle)

La procédure est identique pour les femelles.



Fig-8

Fig-8

Procédure achevée.

Procédure 2 B : Medaka japonais (*Oryzias latipes*), pré-traitement du foie pour le dosage de la vitellogénine

Retirer la bouteille contenant le tampon d'homogénat du kit ELISA et la refroidir avec de la glace pilée (température de la solution : ≤ 4 °C). Si un tampon d'homogénat provenant d'un kit ELISA EnBio est utilisé, laisser décongeler la solution à température ambiante, puis conserver la bouteille au frais avec de la glace pilée.

Calculer le volume de tampon d'homogénat pour le foie à partir du poids de ce dernier (utiliser 50 μ l de tampon d'homogénat par mg de foie pour l'homogénat). Exemple : Si le foie pèse 4.5 mg, le volume de tampon d'homogénat pour le foie sera de 225 μ l. Dresser une liste des volumes de tampon d'homogénat pour tous les foies.

Préparation du foie pour le pré-traitement

- (1) Retirer le microtube de 1.5 ml contenant le foie du congélateur juste avant le pré-traitement.
- (2) Le pré-traitement du foie des mâles est effectué avant celui des femelles pour éviter toute contamination de la vitellogénine. De plus, le pré-traitement des groupes d'essai est effectué dans l'ordre suivant : témoin, cuve témoin contenant le solvant (s'il y a lieu), concentration minimale, concentration moyenne, concentration maximale et témoin positif.
- (3) Le nombre de microtubes de 1.5 ml contenant les échantillons hépatiques sortis du congélateur à un moment donné ne dépasse pas le nombre de tubes pouvant être centrifugés à ce moment-là.
- (4) Placer les microtubes de 1.5 ml contenant les échantillons hépatiques dans le bac de glace selon l'ordre de numérotation des spécimens (la décongélation du foie n'est pas utile).

Déroulement du pré-traitement

1 Ajout du tampon d'homogénéisation

Vérifier sur la liste le volume de tampon d'homogénat à utiliser pour un échantillon hépatique particulier et ajuster la micropipette (gamme de volumes : 100-1 000 μ l) au volume approprié. Attacher un embout propre à la micropipette.

Retirer le tampon d'homogénat du flacon de réactif et ajouter le tampon dans le microtube de 1.5 ml contenant le foie.

Ajouter le tampon dans tous les microtubes de 1.5 ml contenant les échantillons hépatiques selon la procédure décrite ci-dessus. Il n'est pas nécessaire de remplacer l'embout de la micropipette par un embout neuf. Toutefois, si l'embout est contaminé ou suspect de contamination, il est changé.

2 Homogénéisation du foie

- (1) Attacher un nouveau pilon d'homogénéisation à l'homogénéisateur du microtube.
- (2) Introduire le pilon dans le microtube de 1.5 ml. Maintenir l'homogénéisateur pour presser le foie entre la surface du pilon et la paroi interne du microtube.
- (3) Faire fonctionner l'homogénéisateur pendant 10 à 20 secondes. Conserver le microtube au frais avec de la glace pilée pendant l'opération.
- (4) Retirer le pilon du microtube et laisser reposer pendant une dizaine de secondes. Procéder ensuite à une inspection visuelle de l'état de la suspension.

- (5) Si des morceaux de foie sont observés dans la suspension, répéter les opérations (3) et (4) pour obtenir un homogénat de foie satisfaisant.
- (6) Conserver l'homogénat hépatique en suspension dans le bac de glace jusqu'à sa centrifugation.
- (7) Utiliser un pilon neuf pour chaque homogénat.
- (8) Homogénéiser tous les foies avec un tampon d'homogénat selon la procédure décrite ci-dessus.

3 Centrifugation de l'homogénat hépatique en suspension

- (1) Confirmer que la température de la centrifugeuse réfrigérée est $\leq 5^{\circ}\text{C}$.
- (2) Introduire les microtubes de 1.5 ml contenant l'homogénat hépatique en suspension dans la centrifugeuse réfrigérée (rééquilibrer s'il y a lieu).
- (3) Centrifuger l'homogénat hépatique en suspension pendant 10 minutes à 13 000 g à une température $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Toutefois, si les surnageants sont correctement séparés, la force centrifuge et la durée de centrifugation peuvent être ajustées s'il y a lieu.
- (4) Après la centrifugation, vérifier que les surnageants sont correctement séparés (surface : lipides, intermédiaire : surnageant, culot : tissu hépatique). Si la séparation n'est pas concluante, renouveler la centrifugation de la suspension dans les mêmes conditions.
- (5) Retirer tous les échantillons de la centrifugeuse réfrigérée et les placer dans le bac de glace selon l'ordre de numérotation des spécimens. Prendre soin de ne pas remettre en suspension les couches séparées après centrifugation.

4 Collecte du surnageant

- (1) Placer quatre microtubes de 0.5 ml destinés au stockage du surnageant sur le support pour tubes.
- (2) Recueillir 30 μl de chaque surnageant (formant la couche intermédiaire après séparation) à l'aide de la micropipette et les verser dans un microtube de 0.5 ml. Prendre soin de ne pas recueillir de lipides de la surface ou de tissu hépatique du culot.
- (3) Recueillir le surnageant et le verser dans deux autres microtubes de 0.5 ml selon la procédure décrite ci-dessus.
- (4) Recueillir le reste du surnageant à l'aide de la micropipette (si possible : $\geq 100 \mu\text{l}$). Verser ensuite le surnageant dans le microtube de 0.5 ml restant. Prendre soin de ne pas recueillir de lipides de la surface ou de tissu hépatique du culot.
- (5) Fermer le microtube de 0.5 ml avec le capuchon et inscrire le volume de surnageant sur l'étiquette. Placer immédiatement les microtubes dans le bac de glace.
- (6) Remplacer l'embout de la micropipette par un embout neuf pour chaque surnageant. Si une grande quantité de lipides adhère à l'embout, remplacer immédiatement ce dernier par un embout neuf pour éviter la contamination de l'extrait hépatique avec la graisse.
- (7) Verser tout le surnageant centrifugé dans quatre microtubes de 0.5 ml selon la procédure décrite ci-dessus.
- (8) Après avoir versé le surnageant dans les microtubes de 0.5 ml, placer tous ces derniers sur le support pour tubes avec leur étiquette d'identification, puis les mettre immédiatement au congélateur. Si les concentrations de VTG sont mesurées immédiatement après le pré-traitement, conserver au frais un microtube de 0.5 ml (contenant 30 μl de surnageant) dans le support pour tubes et le transférer jusqu'au poste de travail où l'essai ELISA est conduit. Dans ce cas, placer les microtubes restants dans les supports pour tubes et mettre le tout au congélateur.
- (9) Après la collecte du surnageant, jeter le résidu comme il se doit.

Stockage des spécimens

Stocker les microtubes de 0.5 ml contenant le surnageant de l'homogénat hépatique à une température $\leq -70^{\circ}\text{C}$ jusqu'à la conduite de l'essai ELISA.

Procédure 3A : Poisson-zèbre, prélèvement sanguin dans l'artère / la veine caudale

Immédiatement après anesthésie, le pédoncule caudal est sectionné transversalement, et un prélèvement sanguin est effectué dans l'artère / la veine caudale grâce à un tubule capillaire à microhématocrite héparinisé. Les volumes sanguins collectés varient entre 5 et 15 µl selon la taille du poisson. Un volume identique de tampon d'aprotinine [6 microgrammes/ml de solution tampon phosphate (PBS)] est ajouté dans le tube microcapillaire, et le plasma est séparé du sang par centrifugation (5 minutes à 600 g). Le plasma est versé dans des tubes à essais puis stocké à une température de -20 °C jusqu'au dosage de la vitellogénine ou d'autres protéines produisant des effets intéressants.

Procédure 3B : Poisson-zèbre, prélèvement sanguin par ponction cardiaque

Pour éviter la coagulation du sang et la dégradation de la protéine, les échantillons sont collectés sur une solution tampon phosphate (PBS) contenant de l'héparine (1 000 unités/ml) et de l'aprotinine, un inhibiteur de protéase (2 TIU/ml). Pour constituer le tampon, il est recommandé d'utiliser de l'héparine, du sel d'ammonium et de l'aprotinine lyophilisée. Pour le prélèvement sanguin, une seringue (1 ml) munie d'une fine aiguille fixe (Braun Omnikan-F, par exemple) est recommandée. La seringue est pré-remplie avec le tampon (approximativement 100 microlitres) afin d'éluer complètement les faibles volumes sanguins de chaque poisson. Les prélèvements sanguins sont effectués par ponction cardiaque. Tout d'abord, le poisson est anesthésié avec du MS-222 (100 mg/l). Le bon plan d'anesthésie est celui qui permet à l'utilisateur de distinguer le battement du cœur du poisson-zèbre. Pendant la ponction cardiaque, maintenir le piston de la seringue sous faible tension. Les volumes sanguins pouvant être collectés varient entre 20 et 40 microlitres. Après la ponction cardiaque, le mélange sang/tampon est placé dans le tube à essais. Le plasma est séparé du sang par centrifugation (20 minutes à 5 000 g) et est stocké à une température de -80°C jusqu'à l'analyse.

Procédure 3C : POS : Poisson-zèbre, homogénéisation de la tête et de la queue

1. Les poissons sont anesthésiés puis euthanasiés conformément à la description de l'essai.
2. La tête et la queue du poisson sont coupées comme indiqué sur la figure 1. **Note importante :** *Tous les instruments de dissection ainsi que la planche à découper sont rincés et lavés correctement (avec de l'éthanol à 96 %, par exemple) entre chaque manipulation de poisson pour éviter que la vitellogénine des femelles ou des mâles induits ne « pollue » les mâles non-induits.*

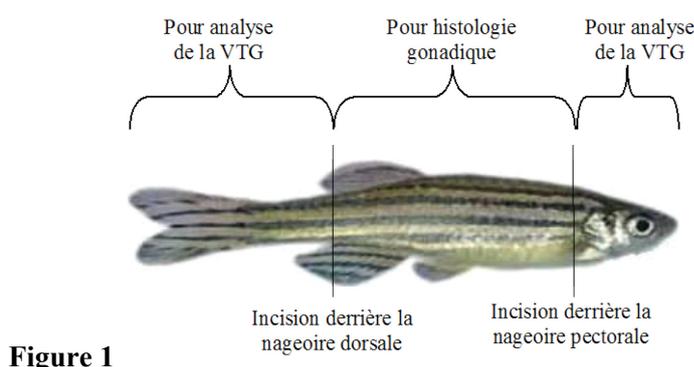


Figure 1

3. L'ensemble tête-queue de chaque poisson est pesé au mg prêt.
4. Après avoir été pesés, les morceaux sont placés dans des tubes appropriés (Eppendorf de 1.5 ml, par exemple) et stockés à une température de -80 °C jusqu'à leur homogénéisation ou bien directement homogénéisées sur de la glace avec deux pilons en plastique. (D'autres méthodes peuvent être utilisées si

elles impliquent de la glace et permettent d'obtenir une masse homogène). Note importante : *Les tubes sont numérotés correctement de façon que la tête et la queue du poisson puissent être reliées à la partie du corps correspondante utilisée pour l'histologie gonadique.*

5. Après obtention d'une masse homogène, on ajoute un **tampon d'homogénéisation*** glacé représentant 4 x la masse pondérale tissulaire. Continuer à pilonner jusqu'à ce que le mélange soit homogène. Note importante : *De nouveaux pilons sont utilisés pour chaque poisson.*
6. Les échantillons sont placés sur de la glace jusqu'à centrifugation à 50 000 g pendant 30 min. et à une température de 4°C.
7. Utiliser une pipette pour répartir des portions de 20 µl de surnageant dans **au moins deux** tubes en plongeant l'embout de la pipette sous la couche lipidique située à la surface et en aspirant doucement le surnageant sans fraction lipidique ni culot.
8. Les tubes sont stockés à une température de -80°C jusqu'à leur utilisation.

***Tampon d'homogénéisation :**

- [50 mM de Tris-HCl de pH 7.4 ; 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma)] : 12 ml de Tris-HCl de pH 7.4 + 120 µl de cocktail d'inhibiteurs de protéase.

- TRIS : TRIS-ULTRA PURE (ICN) de chez Bie & Berntsen (Danemark), par exemple.

- Cocktail d'inhibiteurs de protéase : de chez Sigma (pour les tissus mammaliens). Numéro de produit **P 8340**.

NOTE : Le tampon d'homogénéisation est utilisé le jour de sa fabrication. Placer sur de la glace pendant son utilisation.

ANNEXE 7ÉCHANTILLONS FORTIFIÉS DE VITELLOGÉNINE
UTILISANT UN ÉTALON DE RÉFÉRENCE INTER-ESSAIS

Chaque jour où des essais d'induction de la vitellogénine sont effectués, un échantillon fortifié préparé à l'aide d'un étalon de référence inter-essais sera analysé. La vitellogénine utilisée pour préparer l'étalon de référence inter-essais sera issue d'un lot différent de celui utilisé pour préparer les solutions-étalons pour l'essai en cours.

Pour préparer l'échantillon fortifié, on ajoutera une quantité connue d'étalon inter-essais à un échantillon de plasma de mâle témoin. L'échantillon sera fortifié jusqu'à atteindre une concentration de vitellogénine de 10 à 100 fois supérieure à la concentration de vitellogénine attendue chez les mâles témoins. L'échantillon de plasma ainsi fortifié peut provenir d'un seul poisson ou de plusieurs poissons.

Un sous-échantillon du plasma de mâle témoin non fortifié sera analysé dans au moins deux puits dupliqués. L'échantillon fortifié sera aussi analysé dans au moins deux puits dupliqués. La quantité moyenne de vitellogénine dans les deux échantillons non fortifiés de plasma de mâle témoin sera ajoutée à la quantité calculée de vitellogénine ajoutée pour fortifier les échantillons afin de déterminer la concentration attendue. Le rapport entre cette concentration attendue et la concentration mesurée sera noté avec les résultats de chaque série d'essais effectués le même jour.

ANNEXE 8

Ordinogramme d'analyse statistique

| | |
|---|--|
| Determine whether Dose-Response is monotone | Déterminer si la courbe dose-réponse est monotone |
| Monotone | Monotone |
| Not monotone | Non monotone |
| Step-down trend test on replicate means | Test de comparaison de moyennes répliquées |
| Rep means normal & homogeneous | Moyennes répliquées normales et homogènes |
| Rep means not normal or not homogeneous | Moyennes répliquées non normales ou non homogènes |
| Step-down Jonckheere or Williams' test | Test de Jonckheere ou de Williams |
| Step-down Jonckheere test | Test de Jonckheere |
| Rep means normally distributed | Distribution normale des moyennes répliquées |
| Rep means not normally distributed | Distribution non normale des moyennes répliquées |
| Variances equal | Variances égales |
| Dunnett test | Test de Dunnett |
| Variances unequal | Variances hétérogènes |
| Variance stabilizing transform? | Transformation stabilisant la variance ? |
| ≤ 3 reps per conc | ≤ 3 répliquats par concentration |
| ≥ 4 reps per conc | ≥ 4 répliquats par concentration |
| Dunn Test | Test de Dunnett |
| Dunn or Mann-Whitney test | Test de Dunnett ou de Mann-Whitney |
| Tamhane-Dunnett test | Test de Tamhane-Dunnett |
| Normalizing transform? | Transformation normalisante ? |
| Nested ANOVA normal | ANOVA hiérarchique normale |
| Nested ANOVA not normal | ANOVA hiérarchique non normale |
| Dunnett test in nested ANOVA | Test de Dunnett pour l'ANOVA hiérarchique |
| Tamhane-Dunnett test on nested ANOVA | Test de Tamhane-Dunnett pour l'ANOVA hiérarchique |
| Dunn Test on rep means | Test de Dunnett sur les moyennes répliquées |
| Dunn or Mann-Whitney test on rep means | Test de Dunnett ou de Mann-Whitney sur les moyennes répliquées |

