

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

### **Essai de croissance et de développement de larves d'amphibiens (LAGDA)**

#### **INTRODUCTION**

1. Le développement et la validation d'un essai capable de détecter et de caractériser les conséquences néfastes de l'exposition à des produits chimiques toxiques chez les amphibiens sont devenus nécessaires du fait des inquiétudes relatives à la présence dans l'environnement de produits chimiques dans des teneurs susceptibles de provoquer des effets néfastes sur les humains et la faune. La ligne directrice pour l'essai de croissance et de développement de larves d'amphibiens (LAGDA) décrit un essai de toxicité mené sur une espèce d'amphibiens ; cet essai (d'une durée de 16 semaines, en général) consiste à étudier la croissance et le développement des amphibiens depuis la fécondation jusqu'à la période juvénile précoce. Il permet d'évaluer le développement initial, la métamorphose, la survie, la croissance et la maturation partielle du système reproducteur. Il permet également de mesurer une série d'autres effets observés en vue d'une évaluation diagnostique des produits chimiques suspectés d'être des perturbateurs endocriniens, ou d'autres types de substances ayant des effets toxiques sur le développement et la reproduction. La méthode décrite ici est inspirée des travaux de validation menés sur le xénope lisse (*Xenopus laevis*) par l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (U.S. EPA) avec l'aide du Japon (1). D'autres espèces d'amphibiens peuvent convenir à un protocole d'essai sur la croissance et le développement à même de déterminer si le sexe génétique est un élément important, mais les méthodes et effets observés spécifiques décrits dans la présente ligne directrice s'appliquent exclusivement à *Xenopus laevis*.

2. Le LAGDA est utilisé comme essai de niveau supérieur sur amphibien pour recueillir des informations plus complètes sur les relations concentration-réponse induisant des effets néfastes, informations qui servent ensuite pour l'identification et la caractérisation des dangers ainsi que pour l'évaluation du risque écologique. Le présent essai se positionne au niveau 4 du Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens, sachant que les essais *in vivo* fournissent également des données sur les effets néfastes basées sur les effets mesurés pertinents du système endocrinien (2). Le plan expérimental général comprend l'exposition d'embryons de *X. laevis* au stade de développement 8-10 d'après Nieuwkoop et Faber (NF) (3) à un minimum de quatre concentrations différentes du produit chimique testé (généralement espacées par des intervalles définis selon une

progression semi-logarithmique) et un/des témoin(s) jusqu'à 10 semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le témoin, avec un sous-échantillon provisoire au stade NF62 ( $\leq 45$  jours post-fécondation ; habituellement autour de 45 jpf). Chaque concentration d'essai est testée sur quatre réplicats, avec huit réplicats pour le témoin. Les effets observés évalués au cours de l'exposition (dans le sous-échantillon provisoire et l'échantillon final à l'achèvement de l'essai) sont ceux qui constituent des indicateurs de toxicité générale, à savoir mortalité, comportement anormal et déterminants de la croissance (longueur et poids), ainsi que ceux conçus pour caractériser les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens ciblant les processus physiologiques faisant intervenir les œstrogènes, les androgènes et la thyroïde. La méthode décrite vise principalement à mettre en évidence des effets potentiels pertinents au niveau d'une population (à savoir des impacts indésirables sur la survie, le développement, la croissance et le développement du système reproducteur) afin de calculer une concentration sans effet observé (CSEO) ou une concentration efficace à x % (CE<sub>x</sub>) sur l'effet observé. Il convient de noter que les approches de type CE<sub>x</sub> sont rarement adaptées aux études de grande ampleur de ce type, où l'augmentation du nombre de concentrations d'essai en vue de déterminer la CE<sub>x</sub> souhaitée peut être impraticable. Il convient également de noter que cette méthode ne couvre pas la phase de reproduction proprement dite. Les définitions utilisées dans cette Ligne directrice sont données à l'annexe 1.

### REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

3. Étant donné le nombre limité de produits chimiques testés et le nombre limité de laboratoires impliqués dans l'étude de validation de cette méthode d'essai complexe, on peut s'attendre à ce que la Ligne directrice soit réexaminée et si nécessaire mise à jour à la lumière de l'expérience acquise, et quand un nombre suffisant d'études sera disponible pour s'assurer de l'impact de cette méthode d'essai. Le LAGDA est un essai important qui permet d'étudier les facteurs pouvant contribuer à un déclin de la population d'amphibiens en évaluant les effets de l'exposition à des produits chimiques durant le stade larvaire, où les effets sur la survie et le développement, y compris le développement normal des organes reproducteurs, peuvent avoir des répercussions dommageables sur les populations.

4. Le test est conçu pour détecter des effets apicaux résultant de mécanismes endocriniens et non endocriniens, et comprend des paramètres diagnostiques mesurés qui sont, en partie, spécifiques aux principaux mécanismes endocriniens. Il convient de noter que, jusqu'à ce que le LAGDA soit développé, il n'existait aucun essai validé remplissant cette fonction pour les amphibiens.

5. Avant de commencer l'essai, il est important de disposer d'informations sur les propriétés physico-chimiques du produit chimique testé, notamment pour pouvoir produire des solutions chimiques stables. Il est également nécessaire de disposer d'une méthode d'analyse suffisamment sensible pour pouvoir vérifier les concentrations du produit chimique testé. L'essai dure 16 semaines environ et nécessite au total 480 animaux, à savoir des embryons de *X. laevis*, (ou 640 embryons en cas d'utilisation d'un témoin avec solvant) afin que l'essai soit suffisamment puissant pour évaluer les effets observés au niveau de la population (croissance, développement et maturation du système reproducteur, par exemple).

6. Avant d'utiliser la Ligne Directrice pour tester un mélange à des fins réglementaires, il convient de vérifier si les résultats seront acceptables dans le cadre réglementaire imposé. En outre, cet essai n'évalue pas directement la fécondité, de sorte qu'il peut ne pas être applicable pour une utilisation à un stade plus avancé que le niveau 4 du Cadre conceptuel de l'OCDE.

## FONDEMENT SCIENTIFIQUE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

7. Une grande partie des connaissances dont nous disposons sur la biologie des amphibiens ont été obtenues à l'aide de l'espèce de laboratoire modèle *X. laevis*. Cette espèce peut être cultivée en routine au laboratoire, l'ovulation peut être induite par l'emploi de gonadotrophine chorionique humaine (hCG), et il est possible de se procurer facilement des animaux auprès des fournisseurs commerciaux.

8. Comme chez tous les vertébrés, la reproduction des amphibiens est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (HHG) (4). Les œstrogènes et les androgènes sont des médiateurs de ce système endocrinien ; ils contrôlent le développement et la physiologie des tissus sexuellement dimorphiques. Le cycle de vie des amphibiens se décompose en trois phases successives durant lesquelles cet axe est particulièrement actif : (1) la différenciation gonadique pendant le développement larvaire, (2) le développement des caractères sexuels secondaires et la maturation des gonades pendant la phase juvénile et (3) la reproduction fonctionnelle des adultes. À chacune de ces trois phases de développement, le système endocrinien est susceptible d'être perturbé par certains produits chimiques (œstrogènes et androgènes, par exemple), ce qui finira par entraîner une diminution de la capacité de reproduction des organismes.

9. Les gonades commencent à se développer au stade NF 43 d'après Nieuwkoop et Faber, au moment de la formation de la crête génitale bipotentielle. La différenciation des gonades commence au stade NF 52 lorsque les cellules germinales primordiales migrent vers le tissu médullaire (mâles) ou bien restent dans la région corticale (femelles) des gonades en développement (3). Ce processus de différenciation sexuelle des gonades a été signalé pour la première fois comme sensible à l'action des produits chimiques chez *Xenopus laevis* dans les années 1950 (5) (6). L'exposition de têtards à l'œstradiol durant cette période de différenciation gonadique provoque un changement de sexe chez les mâles, qui deviennent des femelles pleinement fonctionnelles une fois parvenus à l'âge adulte (7) (8). L'inversion fonctionnelle du sexe des femelles en mâles est également possible et a été rapportée après l'implantation de tissu testiculaire sur des têtards (9). Cependant, si l'exposition à un inhibiteur de l'aromatase entraîne également un changement de sexe fonctionnel chez *X. tropicalis* (10), cet effet n'a pas été constaté chez *X. laevis*. Historiquement, les effets de produits toxiques sur la différenciation gonadique étaient évalués par l'examen histologique des gonades au moment de la métamorphose, et le changement de sexe ne pouvait être déterminé que par l'analyse des sex-ratios génotypiques/phénotypiques. Jusqu'à une date récente, il n'existait aucun moyen de déterminer directement le sexe génétique de *Xenopus*. Cependant, la création récente de marqueurs sexuels chez *X. laevis* permet de déterminer le sexe génétique et d'identifier directement les animaux dont le sexe a changé (11).

10. Les mâles juvéniles se développent au fur et à mesure de l'augmentation des taux sanguins de testostérone correspondant au développement des caractères sexuels secondaires et des testicules. Chez les femelles, l'œstradiol est produit par les ovaires, ce qui entraîne l'apparition de vitellogénine (VTG) dans le plasma et d'ovocytes vitellogéniques dans l'ovaire, ainsi que le développement des oviductes (12). Les oviductes sont des caractères sexuels secondaires féminins qui interviennent dans la maturation des ovocytes pendant la reproduction. Les ovocytes s'entourent d'une gangue gélatineuse lorsqu'ils transitent par l'oviducte et s'accumulent dans l'ovisac, prêts à être fécondés. Le développement de l'oviducte semble être régulé par les œstrogènes, puisqu'il est corrélé aux taux sanguins d'œstradiol chez *X. laevis* (13) et *X. tropicalis* (12). Le développement d'oviductes chez les mâles exposés à des biphényles polychlorés (14) et au 4-*tert*-octylphénol (15) a été signalé.

**PRINCIPE DE L'ESSAI**

11. La conception de l'essai implique d'exposer par voie aquatique des embryons de *X. laevis* au stade NF 8-10 à quatre concentrations différentes du produit chimique testé et un/des témoin(s) jusqu'à 10 semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le témoin, avec un sous-échantillon intermédiaire au stade NF62. S'il est aussi envisageable d'administrer des produits chimiques hautement hydrophobes via l'alimentation, cette voie d'exposition n'a guère été explorée dans cet essai jusqu'à présent. Chaque concentration d'essai est testée sur quatre réplicats, avec huit réplicats pour chaque témoin. Les effets observés évalués au cours de l'exposition sont ceux qui constituent des indicateurs de toxicité générale (mortalité, comportement anormal et déterminants de la croissance (longueur et poids)) ainsi que ceux conçus pour caractériser les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens ciblant les processus physiologiques faisant intervenir les œstrogènes, les androgènes et la thyroïde (histopathologie de la thyroïde, histopathologie des gonades et du conduit gonadique, développement anormal, vitellogénine plasmatique (optionnel) et sex-ratios génotypiques/phénotypiques).

**CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI**

12. Les critères suivants s'appliquent pour la validité de l'essai :

- La concentration d'oxygène dissous est  $\geq 40$  % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai ;
- La température de l'eau est de  $21 \pm 1$  °C et les différentiels inter-réplicat et inter-traitement n'excèdent pas 1.0 °C ;
- Le pH de la solution d'essai demeure entre 6.5 et 8.5, et les différentiels inter-réplicat et inter-traitement n'excèdent pas 0.5 ;
- Les données disponibles démontrent que la concentration du produit chimique testé en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de  $\pm 20$  % autour des valeurs moyennes mesurées ;
- La mortalité au cours de la période d'exposition est  $\leq 20$  % dans chaque réplicat en ce qui concerne les témoins ;
- La viabilité est  $\geq 70$  % dans le frai choisi pour commencer l'étude ;
- Le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le témoin est  $\leq 45$  jours ;
- Le poids moyen des organismes d'essai au stade NF62 et à la fin de l'essai dans les témoins et les témoins avec solvant (si un solvant est utilisé) atteint  $1.0 \pm 0.2$  et  $11.5 \pm 3$  g, respectivement.

13. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un critère de validité, il est recommandé de disposer pour l'analyse d'au moins trois niveaux de traitement avec trois réplicats non compromis. Une mortalité excessive, ce qui compromet un traitement, est définie comme plus de 4 décès ( $> 20$  %) ne pouvant pas s'expliquer par une erreur technique dans au moins deux réplicats. Au moins trois niveaux de traitement exempts de toxicité manifeste sont nécessaires pour effectuer les analyses. Les signes de toxicité manifeste peuvent comprendre, sans s'y limiter, des animaux flottant à la surface, immobiles au fond du vivier, une nage inversée ou irrégulière, un manque d'activité à la surface et l'absence de réponse au stimulus, des anomalies morphologiques (difformité des membres, par exemple), des lésions hémorragiques et des œdèmes abdominaux.

14. Si un écart par rapport aux critères de validité de l'essai est observé, les conséquences doivent être appréciées au regard de la fiabilité des résultats de l'essai et ces écarts et leur appréciation doivent être consignés dans le rapport d'essai.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

### *Appareillage*

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

- appareil de contrôle de la température (dispositifs de chauffage et de refroidissement réglables à  $21 \pm 1$  °C, par exemple) ;
- thermomètre ;
- microscope binoculaire à dissection et instruments de dissection ;
- caméra numérique dotée d'une résolution minimale de 4 mégapixels et d'une fonction micro (si nécessaire) ;
- balance analytique d'une précision de 0.001 mg ou 1 µg ;
- appareil de mesure de l'oxygène dissous et pH-mètre ;
- appareil de mesure de l'intensité lumineuse capable de fournir des résultats en lux.

### *Eau*

#### *Source et qualité*

16. Toute eau de dilution disponible localement ( eau de source ou eau du robinet filtrée sur charbon, par exemple) et permettant la croissance et le développement normaux de *X. laevis* peut être employée, et des informations concrètes attestant de cette capacité doivent être disponibles. Dans la mesure où la qualité de l'eau est susceptible de varier de façon importante d'une zone à l'autre, elle est évaluée, en particulier en l'absence de données historiques concernant l'usage de cette eau pour élever des larves d'amphibiens. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), des principaux anions et cations (Ca, Mg, Na, K, Cl, SO<sub>4</sub>, par exemple), des pesticides, du carbone organique total et des solides en suspension doit être effectué avant le lancement de l'essai et/ou tous les six mois, par exemple, pour une eau de dilution connue pour être de qualité relativement constante. Certaines caractéristiques chimiques pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à [l'annexe 2](#).

#### *Concentration d'iode dans l'eau employée pour l'essai*

17. Pour que la glande thyroïde puisse synthétiser les hormones qui favoriseront une métamorphose normale, les larves doivent disposer de quantités suffisantes d'iode, provenant d'une combinaison de sources aqueuses et alimentaires. Il n'existe aujourd'hui aucune recommandation d'origine empirique concernant les concentrations d'iode minimales dans la nourriture ou l'eau nécessaires pour assurer un bon développement. Cependant, la disponibilité de l'iode est susceptible d'affecter la capacité de réponse du système thyroïdien aux agents actifs sur la thyroïde, un facteur par ailleurs connu pour influencer l'activité basale de cette glande : ce point mérite d'être pris en compte lors de l'interprétation des résultats d'histopathologie de la thyroïde. D'après des travaux précédents, la réussite de l'essai a été démontrée lorsque les concentrations d'iode dans l'eau de dilution (I) sont comprises entre 0.5 et 10 µg/L. Idéalement, la concentration minimale d'iode dans l'eau de dilution au cours de l'essai doit être de

0.5 µg/L (ajouté sous forme de sodium ou de sel de potassium). Lorsque l'essai est mené avec de l'eau désionisée, un supplément d'iode est nécessaire afin d'atteindre cette concentration minimale de 0.5 µg/L. Les concentrations mesurées d'iode dans l'eau de l'essai (eau de dilution) et l'ajout d'iode ou d'autres sels (en cas d'utilisation) à l'eau de l'essai sont notifiés dans le rapport. La teneur en iode peut aussi être mesurée dans la nourriture, en plus de l'eau de l'essai.

### ***Système d'exposition***

18. L'essai a été développé en utilisant un système de dilution dynamique est employé pour cet essai. Les composants du système sont constitués d'un matériau adapté au contact avec l'eau, comme le verre, l'acier inoxydable ou d'autres matériaux chimiquement inertes. Les viviers d'exposition sont constitués d'aquariums de verre ou d'acier inoxydable, le volume utilisable étant compris entre 4.0 et 10.0 L (profondeur minimum de l'eau de 10 à 15 cm). Le système doit être capable de prendre en charge l'ensemble des concentrations d'exposition, un témoin seul et un témoin avec solvant, si nécessaire, chaque concentration d'essai étant testée sur quatre réplicats, avec huit réplicats pour les témoins. La vitesse d'écoulement de chaque récipient est constante afin de garantir la stabilité des conditions biologiques et de l'exposition chimique. Il est recommandé de maintenir dans les viviers un débit approprié (minimum cinq renouvellements par jour, par exemple) afin d'éviter une baisse de la concentration de produit chimique du fait du métabolisme des organismes d'essai et des microorganismes aquatiques présents dans les aquariums, des voies de dégradation abiotiques (hydrolyse, photolyse) ou de la dissipation (volatilisation, sorption). Les viviers sont disposés de manière aléatoire au sein du système d'exposition, de manière à amoindrir les effets éventuellement liés à la position, notamment de légères variations de température, d'intensité lumineuse, etc. On trouvera des informations complémentaires concernant la mise en place de systèmes d'exposition dynamiques dans le guide de l'ASTM intitulé *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

### ***Introduction des produits chimiques : préparation des solutions d'essai***

19. Pour préparer les solutions d'essai dans le système d'exposition, il convient d'introduire dans le système une solution-mère du produit chimique testé à l'aide d'une pompe appropriée ou d'un autre appareil. Le débit de la solution-mère doit être calibré d'après les données analytiques relatives aux solutions d'essai établies avant le début de l'exposition, et faire l'objet d'un contrôle volumétrique périodique au cours de l'essai. La solution d'essai de chaque vivier doit être renouvelée à raison de cinq renouvellements en volume/jour au minimum.

20. La méthode employée pour introduire le produit chimique testé dans le système varie en fonction des propriétés physico-chimiques du produit concerné. Par conséquent, avant la mise en œuvre de ce protocole, il convient de collecter les informations de référence sur le produit chimique en question pour déterminer sa testabilité. En ce qui concerne les propriétés du produit chimique testé, les informations suivantes sont utiles : formule structurale, poids moléculaire, pureté, stabilité dans l'eau et à la lumière, pKa et Ko/e, hydrosolubilité (de préférence dans le milieu d'essai) et pression de vapeur, ainsi que résultats d'un essai de biodégradabilité facile (LD 301 (17) ou LD 310 (18) de l'OCDE). On peut utiliser la solubilité et la pression de vapeur pour calculer la constante de Henry, qui indique les risques de perte par évaporation du produit chimique testé. La conduite de cet essai sans les informations énumérées ci-dessus doit être envisagée avec prudence sachant que la conception de l'essai sera fonction des propriétés physico-chimiques du produit chimique testé et que, sans ces données, les résultats de l'essai peuvent se révéler difficiles à interpréter voire dénués de sens. Pour déterminer la concentration du produit chimique testé dans les solutions d'essai, il convient d'appliquer une méthode d'analyse fiable, dont la précision et la limite de détection sont connues et mentionnées dans le rapport. Les composés hydrosolubles peuvent être mis en solution en aliquotes dans l'eau utilisée pour l'essai à des concentrations aboutissant à la teneur voulue dans le cadre d'une introduction au moyen d'un système dynamique. Les produits chimiques qui

sont liquides ou solides à température ambiante et modérément hydrosolubles peuvent nécessiter des saturateurs liquide:liquide ou liquide:solide (colonne de laine de verre, par exemple) (19). Même s'il est également possible d'administrer des substances d'essai très hydrophobes par le biais de l'alimentation, cette voie d'exposition n'a guère été explorée jusqu'à présent dans cet essai.

21. Les solutions testées de concentrations choisies sont préparées par dilution d'une solution mère. La solution mère est préparée de préférence en mélangeant simplement ou en agitant le produit chimique testé dans de l'eau de dilution par des moyens mécaniques (e.g. par agitation ou par ultrasons). Des colonnes ou des systèmes de saturation ou des méthodes de dosage passif (20) peuvent être utilisées pour obtenir une solution mère suffisamment concentrée. Les systèmes dépourvus de véhicules sont préférables ; cependant les différents produits chimiques testés possèdent des propriétés physico-chimiques variables, qui réclament des approches diverses pour la préparation des solutions aqueuses servant à l'exposition chimique. On s'efforcera dans toute la mesure du possible d'éviter l'emploi de solvants et autres véhicules car : (1) certains solvants peuvent avoir eux-mêmes des effets toxiques et/ou induire des réponses indésirables ou inattendues, (2) l'essai de produits chimiques à une concentration supérieure à leur solubilité dans l'eau (ce qui arrive fréquemment si des solvants sont utilisés) peut fausser la détermination des concentrations efficaces, (3) le recours aux solvants dans les essais à long terme peut se traduire par la formation importante de biofilms associés à une activité microbienne, ce qui peut influencer sur les conditions environnementales et sur la capacité de maintenir les concentrations d'exposition, (4) en l'absence de données historiques démontrant que le solvant n'influe pas sur les résultats de l'étude, l'usage de solvants nécessite le traitement d'un groupe témoin avec solvant, ce qui a des effets significatifs en termes de bien-être animal, des animaux supplémentaires étant alors nécessaires pour la conduite de l'essai. Pour les produits chimiques difficiles à tester, un solvant peut être employé en dernier ressort, et l'on consultera alors le Document d'orientation de l'OCDE n° 23 sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges « difficiles » (21) afin de déterminer la meilleure méthode à employer. Le solvant sera choisi en fonction des propriétés chimiques du produit chimique testé et de la disponibilité de données des témoins historiques sur le solvant. En l'absence de données historiques, il est nécessaire de déterminer la pertinence du solvant avant de procéder à l'étude définitive. Si le recours à un solvant est inévitable et si une activité microbienne (formation de biofilms) se produit, il est recommandé de noter/consigner dans le rapport la présence de biofilms dans chaque vivier (au moins une fois par semaine) pendant toute la durée de l'essai. Idéalement, la concentration de solvant devra être maintenue constante dans le témoin avec solvant et tous les groupes traités. Si la concentration de solvant n'est pas maintenue constante, c'est la plus forte concentration de solvant dans le traitement d'essai qui sera utilisée dans le témoin avec solvant. Si un solvant est utilisé comme véhicule, les concentrations maximales de solvant ne devront pas dépasser 100 µL/L ou 100 mg/L (21), et il est recommandé de maintenir la concentration de solvant aussi basse que possible ( $\leq 20$  µL/L, par exemple) pour éviter que le solvant puisse avoir une incidence sur les effets mesurés (22).

### ***Animaux d'essai***

#### *Espèces d'essai*

22. L'espèce d'essai *X. laevis* est utilisée, car il s'agit d'une espèce : (1) élevée couramment dans les laboratoires du monde entier, (2) aisément accessible auprès de fournisseurs commerciaux et (3) dont le sexe génétique peut être déterminé.

#### *Soin et reproduction des adultes*

23. Les méthodes de soin et de reproduction adaptées à *X. laevis* sont décrites dans un guide de l'ASTM (23). Les conditions d'encagement de *X. laevis* et les méthodes de soin adaptées à cette espèce sont également décrites par Read (24). Pour provoquer la reproduction, entre trois et cinq paires d'adultes mâles et femelles reçoivent une injection intrapéritonéale de gonadotropine chorionique humaine (hCG). La dose injectée aux femelles et aux mâles s'élève respectivement à environ 800 UI – 1 000 UI et 500 UI – 800 UI de hCG dissous dans une solution saline à 0.6 – 0.9 % (ou une solution de Ringer isotonique saline applicable aux amphibiens ; [www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html](http://www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html)). Les volumes injectés sont équivalents à environ 10 µl/g de poids corporel (~1 000 µl). Ensuite, les couples de reproducteurs sont placés dans de grands viviers, à l'abri des perturbations et dans des conditions statiques, en vue de stimuler l'amplexus. Chaque vivier de reproduction est équipé d'une grille en acier inoxydable en guise de faux plancher (ouvertures de 1.25 cm, par exemple), permettant aux amas d'œufs de tomber dans un double fond. Si les grenouilles reçoivent une injection de hCG en fin d'après-midi, elles déposent habituellement la majorité de leurs œufs vers le milieu de la matinée suivante. Lorsqu'une quantité suffisante d'œufs ont été libérés et fécondés, il convient de retirer les adultes des viviers de reproduction. Les œufs sont alors collectés, et la gangue gélatineuse est éliminée par traitement à la L-cystéine (23). Une solution de L-cystéine à 2 % est préparée, et le pH est ajusté à 8.1 avec du NaOH 1 M. Cette solution à 21 °C est versée dans un flacon Erlenmeyer de 500 mL contenant les œufs d'un seul frai, brassée délicatement pendant une à deux minutes, puis rincée soigneusement 6 à 8 fois avec de l'eau de culture à 21 °C. Les œufs sont ensuite transférés dans un cristalliseur, et leur viabilité est déterminée : elle doit être > 70 % et les embryons en phase de division cellulaire doivent présenter des anomalies minimales.

## CONCEPTION DE L'ESSAI

### *Concentrations d'essai*

24. Il est recommandé d'utiliser un minimum de quatre concentrations du produit chimique testé et des témoins appropriés (comprenant, si nécessaire, des témoins avec solvant). En règle générale, il est recommandé d'espacer les concentrations d'un facteur ne dépassant pas 3.2.

25. Pour les besoins de cet essai, on s'appuiera autant que possible sur les résultats d'études existantes sur les amphibiens pour déterminer la concentration d'essai la plus élevée, de manière à éviter des concentrations manifestement toxiques. Les informations fournies, par exemple, par les relations quantitatives structure-activité, les références croisées et les données d'études existantes sur les amphibiens telles que l'essai de métamorphose des amphibiens, LD 231 (25) et le guide de l'ASTM *Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus* (23) et/ou les résultats d'essais sur les poissons (LD 229, LD 234 et LD 236 de l'OCDE) (26) (27) (28) peuvent contribuer à la définition de cette concentration. Avant le lancement du LAGDA, une expérience préliminaire de détermination des gammes de concentration pourra être menée. Il est recommandé de commencer cette expérience dans les 24 heures qui suivent la fécondation et de maintenir l'exposition pendant 7-14 jours (ou plus, si nécessaire), ainsi que de fixer les concentrations d'essai de telle sorte qu'elles soient espacées par un facteur de 10. La gamme de concentrations ainsi obtenue servira à fixer la concentration d'essai maximale dans le LAGDA. On notera que si un solvant doit être utilisé, la pertinence de celui-ci (la question étant de savoir si ce solvant peut influencer sur le résultat de l'étude) pourra être déterminée dans le cadre de la détermination de la gamme de concentrations.

### *Réplicats au sein des groupes traités et des témoins*

26. Un minimum de quatre réplicats par concentration d'essai et un minimum de huit réplicats pour les témoins (et le témoin avec solvant, si nécessaire) sont utilisés (ce qui signifie que le nombre de réplicats

dans le témoin et l'éventuel témoin avec solvant doit être deux fois supérieur au nombre de réplicats dans chaque groupe traité, pour que l'essai ait une puissance statistique appropriée). Chaque réplicat doit contenir au maximum 20 animaux. Selon la méthode d'essai décrite dans la présente ligne directrice, un minimum de 15 animaux sont traités (cinq pour le sous-échantillon au stade NF62 et 10 juvéniles). Toutefois, des animaux supplémentaires seront ajoutés dans chaque réplicat pour maintenir le nombre critique de 15 en cas de décès.

## PROCÉDURE

### *Synthèse de l'essai*

27. L'essai commence avec des embryons nouvellement frayés (stade NF 8-10) et se poursuit jusqu'au développement des juvéniles. Les animaux sont examinés chaque jour afin de constater d'éventuels décès ou signes de comportement anormal. Au stade NF62, un sous-échantillon de larves (jusqu'à cinq animaux par réplicat) est collecté et la présence de divers effets est recherchée (**tableau 1**). Une fois que tous les animaux ont atteint le stade NF 66, c'est-à-dire à la fin de leur métamorphose (ou 70 jours après le début de l'essai, selon la première éventualité), une sélection est effectuée au hasard (mais sans sous-échantillonnage) afin de réduire le nombre d'animaux (10 par vivier) (voir paragraphe 43) et l'exposition des animaux restants se poursuit jusqu'à 10 semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le témoin. À la fin de l'essai, les échantillons de juvéniles font l'objet de mesures supplémentaires (**tableau 1**).

### *Conditions d'exposition*

28. Un résumé complet des paramètres d'essai est présenté à l'annexe 3. Au cours de la période d'exposition, l'oxygène dissous, la température et le pH des solutions d'essai sont mesurés quotidiennement. La conductivité, l'alcalinité et la dureté sont mesurés une fois par mois. En ce qui concerne la température de l'eau des solutions d'essai, les différentiels inter-réplicat et inter-traitement (sur une journée) ne doivent pas dépasser 1.0 °C. De même, en ce qui concerne le pH des solutions d'essai, les différentiels inter-réplicat et inter-traitement ne doivent pas dépasser 0.5.

29. On pourra siphonner quotidiennement les cuves d'exposition pour éliminer les aliments non consommés et des déchets, en veillant à éviter la contamination croisée des cuves. Il convient d'être attentif à stresser et perturber le moins possible les animaux, en particulier pendant les déplacements, le nettoyage des aquariums et la manipulation. Toute activité ou condition stressante devra être évitée, notamment les bruits forts et/ou constants, les vibrations et les coups au niveau des aquariums.

### *Durée d'exposition au produit chimique testé*

30. L'exposition commence avec des embryons nouvellement frayés (stade NF 8-10) et se poursuit jusqu'à dix semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 ( $\leq 45$  jours après le lancement de l'essai) dans le groupe témoin. En règle générale, la durée du LAGDA est de 16 semaines (17 semaines maximum).

*Lancement de l'essai*

31. On aura démontré précédemment que les parents utilisés pour le lancement de l'essai peuvent avoir une descendance génétiquement sexuée ([annexe 5](#)). Après le frai des adultes, les embryons sont collectés, traités à la cystéine pour éliminer la gangue gélatineuse et sélectionnés en fonction de leur viabilité (ASTM, 2004). Le traitement à la cystéine permet de manipuler les embryons sans que ces derniers collent aux surfaces. La sélection se fait sous un microscope à dissection, en utilisant un compte-gouttes de taille appropriée pour éliminer les embryons non viables. Il est préférable d'utiliser pour l'essai un seul frai donnant une viabilité supérieure à 70 %. Les embryons au stade NF 8-10 sont répartis de façon aléatoire dans les cuves de traitement contenant un volume approprié d'eau de dilution jusqu'à ce que chaque cuve contienne 20 embryons. Il convient de manipuler les embryons avec précaution durant le transfert afin de minimiser leur stress et d'éviter de les blesser. Quatre-vingt-seize (96) heures après la fécondation, les têtards doivent être remontés le long de la colonne d'eau et avoir commencé à s'accrocher aux parois de la cuve.

*Régime alimentaire*

32. Le régime et la fréquence d'alimentation évoluent en fonction des stades de développement de *X. laevis* et représentent un aspect très important du protocole LAGDA. Ainsi, une alimentation excessive au cours de la phase larvaire se traduit généralement par une augmentation des cas de scoliose et de leur gravité ([annexe 8](#)) et doit donc être évitée. À l'inverse, une alimentation insuffisante au cours de la phase larvaire se traduit par des rythmes de développement très variables parmi les témoins, ce qui risque de compromettre la puissance statistique de l'essai ou d'induire des facteurs de confusion pouvant affecter les résultats de l'essai. L'[annexe 4](#) présente le régime alimentaire recommandé pour les larves et les juvéniles de *X. laevis* dans des conditions d'essai dynamique, mais d'autres solutions sont autorisées tant que les organismes d'essai grandissent et se développent de manière satisfaisante. Il importe de noter que s'il s'agit de mesurer les effets sur le système endocrinien, les aliments doivent être exempts de substances actives sur le système endocrinien comme la farine de soja.

*Alimentation des larves*

33. Le régime alimentaire recommandé pour les larves est constitué de nourriture de départ pour truites, de disques de spiruline et de flocons pour poissons rouges (flocons TetraFin®, Tetra, Allemagne, par exemple) mélangés ensemble dans l'eau de culture (ou de dilution). Ce mélange est administré trois fois par jour en semaine et une fois par jour le week-end. Les têtards sont également nourris avec des nauplii de 24 heures d'artémies vivantes, (*Artemia* spp.), deux fois par jour en semaine et une fois par jour le week-end à compter du huitième jour post-fécondation. L'alimentation des larves, qui doit être conforme dans chaque cuve d'essai, doit permettre la croissance et le développement appropriés des animaux d'essai afin d'assurer la reproductibilité et la transférabilité des résultats d'analyse : (1) le délai médian jusqu'au stade NF62 dans les témoins doit être  $\leq 45$  jours et (2) un poids moyen de  $1.0 \pm 0.2$  g au stade NF62 dans les témoins est recommandé.

*Alimentation des juvéniles*

34. Une fois la métamorphose achevée, le régime alimentaire se compose de nourriture de premier choix pour amphibiens de type 3/32 pouces (Xenopus Express, FL, États-Unis) ([annexe 4](#)). Pour les jeunes grenouilles (juvéniles précoces), broyer brièvement les granulés dans un moulin à café ou un mixeur ou bien écrasés dans un mortier avec un pilon afin de réduire leur taille. Une fois que les juvéniles sont assez grands pour consommer des granulés entiers, le broyage / l'écrasement ne sont plus nécessaires. Les animaux sont nourris une fois par jour. L'alimentation des juvéniles doit permettre la croissance et le

développement appropriés des organismes : un poids moyen de  $11.5 \pm 3$  g dans les témoins à la fin de l'essai est recommandé.

### *Analyse chimique*

35. Avant le lancement de l'essai, la stabilité du produit chimique testé (sa solubilité, sa dégradabilité et sa volatilité, par exemple) et toutes les méthodes analytiques nécessaires sont établies d'après les données et connaissances existantes, par exemple. En cas d'administration des doses via l'eau de dilution, il est également conseillé d'analyser chaque concentration d'essai lors de la préparation du système afin d'en vérifier les performances, avant de lancer l'essai. Pendant l'essai, le dosage des concentrations du produit chimique testé est effectué à intervalles réguliers, de préférence chaque semaine pour au moins un réplicat au sein de chaque groupe traité, avec une rotation des réplicats au sein du même groupe traité chaque semaine. Il est recommandé de baser les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si la concentration du produit chimique testé 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. De même, le coefficient de variation (CV) des concentrations tout au long de l'essai dans un traitement doit être maintenu à 20 % maximum pour chaque concentration. Lorsque les concentrations mesurées ne sont pas maintenues dans un intervalle de 80-120 % de la concentration nominale (si l'essai porte sur des produits chimiques facilement biodégradables ou hautement adsorbants, par exemple), les concentrations avec effet doivent être dosées et exprimées par rapport à la moyenne arithmétique des concentrations dans le cas des essais dynamiques.

36. Les débits d'eau de dilution et de solution-mère sont vérifiés à intervalles adéquats (trois fois par semaine, par exemple) pendant toute la durée de l'exposition. Si les produits chimiques se révèlent indétectables à certaines, voire toutes les concentrations nominales, (en raison de leur dégradation rapide ou de leur adsorption dans les cuves d'essai, ou bien d'une accumulation importante de produit chimique dans l'organisme des animaux exposés, par exemple), il est recommandé d'adapter le taux de renouvellement de la solution d'essai dans chaque cuve afin que les concentrations d'essai restent aussi constantes que possible.

### *Observations et effets mesurés*

37. Les effets mesurés au cours de l'exposition correspondent aux indicateurs de toxicité suivants : mortalité, comportement anormal et notamment signes cliniques de maladie et/ou de toxicité générale, et déterminants de la croissance (longueur et poids), ainsi qu'effets pathologiques dus à la fois à une toxicité générale et à des mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens ciblant les processus physiologiques faisant intervenir les œstrogènes, les androgènes et la thyroïde. En outre, la concentration plasmatique de VTG peut être mesurée à la fin de l'essai (optionnel). Le dosage de la VTG peut être utile pour comprendre les résultats de l'étude relatifs aux mécanismes endocriniens des produits chimiques suspectés d'être des perturbateurs endocriniens. Les effets mesurés et le calendrier des mesures sont résumés au **tableau 1**.

Tableau 1. Vue d'ensemble des effets mesurés lors du LAGDA

Effets mesurés*	Quotidiennement	Échantillons intermédiaires (échantillons larvaires)	Fin de l'essai (échantillons de juvéniles)
Mortalité et comportement anormal	X		
Délai jusqu'au stade NF62		X	
Histo(patho)logie (glande thyroïde)		X	
Morphométrie (augmentation du poids et de la longueur)		X	X
Indice hépato-somatique (IHS)			X
Sex-ratios génotypiques/phénotypiques			X
Histopathologie (gonades, conduits reproducteurs, rein et foie)			X
Vitellogénine (VTG) (optionnel)			X

\* Tous les effets mesurés font l'objet d'une analyse statistique.

### *Mortalité et observations quotidiennes*

38. L'ensemble des viviers est vérifié quotidiennement pour détecter les animaux morts, et les décès survenus dans chaque vivier sont notés dans le rapport. Les animaux morts sont retirés du vivier d'essai dès qu'ils sont identifiés. Leur stade de développement doit être classé comme soit antérieur au stade NF 58 (avant l'apparition des membres antérieurs), soit entre les stades NF 58 et NF 62, soit entre les stades NF 63 et NF 66 (entre le stade NF62 et l'absorption totale de la queue) soit postérieur au stade NF 66 (post-larvaire). Les taux de mortalité supérieurs à 20 % sont des indicateurs potentiels de conditions d'essai mal adaptées, ou d'effets toxiques manifestes du produit chimique testé. Les animaux ont tendance à être plus sensibles à des épisodes de mortalité non induite par des produits chimiques au cours des premiers jours de développement qui suivent le frai et pendant le paroxysme métamorphique. Cette mortalité peut apparaître dans les données issues des témoins.

39. En outre, les éventuelles observations de comportement anormal, de malformations visibles (scoliose, par exemple) ou de lésions doivent être notées dans le rapport. Les scolioses observées sont dénombrées (incidence) et classées en fonction de leur indice de gravité (non remarquable – NR, minimale – 1, modérée – 2, grave – 3, par exemple ; voir annexe 8). On s'efforcera de limiter la prévalence des scolioses modérées et graves (en deçà de 10 % dans les témoins, par exemple) tout au long de l'essai, même si une prévalence accrue d'anomalies dans les témoins n'est pas nécessairement une raison pour arrêter l'essai. Un comportement normal se caractérise par la suspension des larves dans la colonne d'eau, la queue élevée au-dessus de la tête, un battement léger de la queue sur un rythme régulier, des remontées périodiques à la surface, un opercule mobile et la réponse aux stimuli. Inversement, un comportement anormal implique notamment des animaux flottant à la surface, immobiles au fond du vivier, une nage inversée ou irrégulière, un manque d'activité à la surface et l'absence de réponse aux stimuli. En ce qui concerne les animaux postmétamorphiques, outre les comportements anormaux évoqués, les différences de consommation de nourriture entre les groupes traités sont consignées lorsqu'elles sont importantes. Les malformations apparentes et les lésions se manifestent éventuellement par des anomalies morphologiques (difformité des membres, par exemple), des lésions hémorragiques, des œdèmes abdominaux et des infections bactériennes ou fongiques, entre autres. L'apparition de lésions sur la tête des juvéniles, juste derrière les narines, peut être l'indication de taux d'humidité insuffisants. Ces déterminations sont d'ordre qualitatif, et sont considérées comme analogues aux signes cliniques de maladies/stress, et toujours

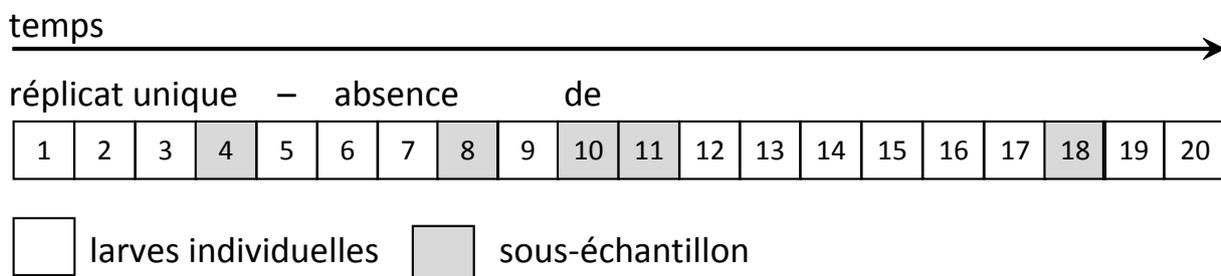
effectuées en comparaison avec les animaux témoins. Un taux d'occurrence supérieur dans les viviers exposés par rapport au groupe témoin constitue la preuve d'une toxicité manifeste.

**Sous-échantillons de larves**

*Description générale de la préparation des sous-échantillons de larves :*

40. Les têtards qui ont atteint le stade NF62 sont retirés des viviers puis soit prélevés soit déplacés dans un nouveau vivier pour la suite de l'exposition, ou bien séparés physiquement des têtards restants dans le même vivier avec un diviseur. Les têtards sont vérifiés quotidiennement, et le jour où un individu atteint le stade NF62 est consigné. La caractéristique déterminante dans le cadre de cette évaluation est la forme de la tête. Une fois que la taille de la tête a diminué au point de sembler à peu près de la même largeur que le tronc du têtard et que les membres antérieurs ont atteint le niveau du milieu du cœur, l'individu considéré est consigné comme ayant atteint le stade NF62.

41. L'objectif est de prélever au total cinq têtards au stade NF62 par réplikat. La procédure employée est aléatoire, mais elle est décidée en amont. La **figure 1** illustre un exemple hypothétique de réplikat. Si 20 têtards survivants sont dénombrés dans un vivier particulier lorsque le premier individu atteint le stade NF62, cinq numéros entre 1 et 20 sont choisis au hasard. Le têtard #1 est le premier individu à atteindre le stade NF62 et le têtard #20 est le dernier individu à atteindre le stade NF62 dans le vivier. De même, si 18 larves survivantes sont dénombrées dans un vivier, cinq numéros entre 1 et 18 sont choisis au hasard. La même procédure est suivie pour chaque réplikat lorsque le premier individu atteint le stade NF62. Si des décès sont constatés lors de l'échantillonnage au stade 62, la procédure aléatoire est appliquée de nouveau aux échantillons restants en fonction du nombre de larves restantes n'ayant pas atteint le stade NF62 et du nombre d'échantillons supplémentaires nécessaires pour atteindre un total de cinq échantillons à partir de ce réplikat. Le jour où un têtard atteint le stade NF62, on consulte le diagramme d'échantillonnage préparé pour déterminer si cet individu doit être prélevé ou être physiquement séparé des têtards restants pour continuer d'être exposé. Dans l'exemple ci-dessous (**figure 1**), le premier individu à atteindre le stade NF62 (cf. case #1) est physiquement séparé des autres larves, continue d'être exposé, et le jour de l'étude où cet individu a atteint le stade NF62 est noté dans le rapport. Par la suite, les individus #2 et #3 sont traités de la même manière que l'individu #1, puis l'individu #4 est prélevé afin d'observer les déterminants de la croissance et de procéder à un examen histologique de la thyroïde (dans cet exemple). Cette procédure se poursuit jusqu'à ce que le 20<sup>e</sup> individu rejoigne les individus restants ayant dépassé le stade NF62 ou soit prélevé. La procédure aléatoire employée garantit une même probabilité d'être sélectionné à tous les individus. Pour cela, toute méthode de choix aléatoire est valable, mais chaque têtard doit être comptabilisé à un moment au cours de la période de sous-échantillonnage avant d'atteindre le stade NF62.



**Figure 1.** Exemple hypothétique d'échantillonnage au stade NF62 dans un réplikat unique

42. Les effets observés sur les sous-échantillons de larves sont les suivants : (1) délai jusqu'au stade NF62 (à savoir, le nombre de jours écoulés entre la fécondation et le stade NF62), (2) anomalies externes, (3) morphométrie (poids et longueur, par exemple) et (4) histologie de la thyroïde.

#### *Euthanasie des têtards*

43. Le sous-échantillon de têtards au stade NF62 (cinq individus par réplicat) est euthanasié par immersion pendant 30 minutes dans des quantités appropriées (500 mL, par exemple) de solution anesthésique (solution à 0.3 % de MS-222, méthanesulfonate de tricaine, CAS.886-86-2, par exemple). La solution de MS-222 doit être tamponnée au bicarbonate de sodium (pH 7.0 environ), car une solution de MS-222 non tamponnée est acide et irritante pour la peau des grenouilles, ce qui entraîne une mauvaise absorption et un stress supplémentaire inutile pour les organismes.

44. Le têtard est retiré de la cuve expérimentale avec une épauvette à filet puis transporté (déposé) dans la solution euthanasique. Après avoir été euthanasié correctement, l'animal est prêt pour la nécropsie lorsqu'il ne réagit plus à des stimuli extérieurs tels que le pincement de la patte arrière avec une paire de forceps.

#### *Morphométrie (poids et longueur)*

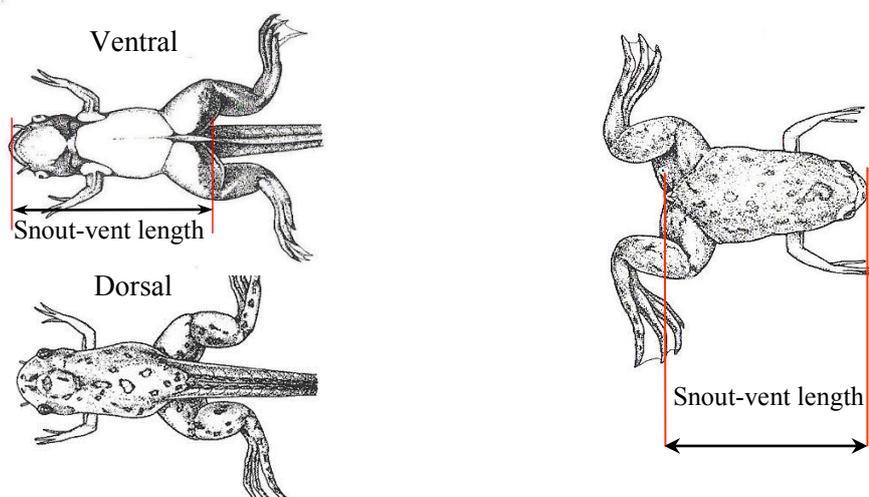
45. Le poids humide (au mg près) et la longueur museau-cloaque (LMC) (à 0.1 mm près) de chaque têtard sont mesurés dès que le têtard ne répond plus aux stimuli sous l'effet de l'anesthésie (**figure 2a**). Il est possible d'utiliser un logiciel d'analyse d'images pour mesurer la LMC à partir d'une photographie. Les têtards sont séchés par tamponnage avant la pesée afin d'éliminer l'eau adhérente en excès. Après le mesurage du poids et de la LMC, les anomalies morphologiques manifestes et/ou signes cliniques de toxicité manifeste tels qu'une scoliose (voir l'annexe 8), les pétéchies (petites hémorragies rouges ou violacées au niveau des capillaires sous-cutanés) et les hémorragies sont consignées, et il est recommandé d'employer une méthode numérique d'identification des anomalies.

#### *Collecte et fixation des tissus*

46. Les glandes thyroïdes du sous-échantillon de larves sont évaluées en vue de l'histologie. La partie inférieure du torse située à l'arrière des membres antérieurs est retirée et jetée. La carcasse découpée est fixée dans du fixateur de Davidson. Le volume de fixateur dans le conteneur doit être supérieur ou égal à 10 fois le volume approximatif des tissus. Le fixateur est agité ou diffusé de manière appropriée pour fixer convenablement les tissus considérés. Tous les tissus restent dans le fixateur de Davidson pendant au moins 48 heures, mais pas plus de 96 heures, après quoi ils sont rincés à l'eau désionisée et stockés dans du formol à 10 % neutre tamponné (1) (29).

#### *Histologie de la thyroïde*

47. Chaque sous-échantillon de larves (tissus fixés) fait l'objet d'une évaluation histologique de la glande thyroïde permettant de poser un diagnostic et d'évaluer l'indice de gravité (29) (30).



**Figure 2.** Repères pour le mesurage de la longueur museau-cloaque dans le LAGDA au stade NF 62 (a) et chez les juvéniles (b). Les caractéristiques définissant le stade NF 62 sont que la tête a la même largeur que le tronc, la longueur du nerf olfactif est plus courte que le diamètre du bulbe olfactif (vue dorsale), et les membres antérieurs sont au même niveau que le cœur (vue ventrale). Les images sont adaptées de Nieuwkoop et Faber (1994)

### *Fin de l'exposition larvaire*

48. Compte tenu du nombre initial de têtards, il est probable qu'un faible pourcentage d'individus ne se développeront pas normalement et n'accompliront pas une métamorphose complète (stade NF66) dans un laps de temps raisonnable. La partie larvaire de l'exposition ne devrait pas excéder 70 jours. Les têtards restants à l'issue de cette période sont euthanasiés (voir paragraphe 43), leur poids humide et leur LMC sont mesurés, leur stade de développement est déterminé d'après Nieuwkoop et Faber (1994) et les éventuelles anomalies du développement sont notées.

### *Sélection après le stade NF66*

49. Dix individus par vivier sont conservés à partir du stade NF66 (résorption totale de la queue) jusqu'à la fin de l'exposition. Par conséquent, une fois que tous les animaux ont atteint le stade NF66 ou à l'expiration d'un délai de 70 jours (selon la première éventualité), une sélection est effectuée. Les animaux ayant atteint le stade NF66 mais qui ne seront pas conservés jusqu'à la fin de l'exposition sont choisis au hasard.

50. Les animaux non sélectionnés pour être conservés jusqu'à la fin de l'exposition sont euthanasiés (voir paragraphe 43). Le stade de développement, le poids humide et la LMC (**figure 2b**) sont mesurés et chaque animal fait l'objet d'une nécropsie macroscopique. Le sexe phénotypique (basé sur la morphologie des gonades) est noté comme étant féminin, masculin ou indéterminé.

*Échantillons de juvéniles**Description générale de la préparation des échantillons de juvéniles :*

51. Les animaux restants continuent d'être exposés jusqu'à 10 semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le témoin contenant l'eau de dilution (et/ou le témoin avec solvant, le cas échéant). À la fin de la période d'exposition, les animaux restants (maximum 10 grenouilles par réplicat) sont euthanasiés, et les divers effets observés sont mesurés ou évalués et consignés : (1) morphométrie (poids et longueur), (2) sex-ratios génotypiques/phénotypiques, (3) poids du foie (indice hépatosomatique), (4) histopathologie (gonades, conduits reproducteurs, foie et reins) et éventuellement (5) VTG plasmatique.

*Euthanasie des grenouilles*

52. Les échantillons de juvéniles (grenouilles post-métamorphiques) sont euthanasiés par injection intrapéritonéale d'un anesthésique (MS-222 à 10 % dans une solution tamponnée de phosphate appropriée, par exemple). Les grenouilles peuvent être prélevées une fois devenues insensibles (habituellement deux minutes environ après l'injection, en cas d'utilisation de MS-222 à 10 % à raison de 0.01 mL par g de grenouille). Les jeunes grenouilles pourraient être immergées dans un anesthésique plus concentré (MS-222), mais l'expérience a montré qu'une anesthésie selon cette méthode prend plus de temps et que cette durée ne convient peut-être pas pour l'échantillonnage. L'injection permet d'euthanasier les animaux de manière rapide et efficace avant l'échantillonnage. Ce dernier ne doit pas démarrer avant confirmation que les grenouilles sont insensibles, le but étant de s'assurer que les animaux sont bien morts. Si les têtards montrent des signes de souffrance considérable (i.e. sévères et que leur mort est prévisible) et que leur état est moribond, les animaux doivent être anesthésiés puis euthanasiés, et traités comme des cas de mortalité lors de l'analyse des données. Quand un têtard est euthanasié dans ce cas sévère, il faut le consigner dans le rapport d'essai. En fonction du moment de l'essai ou le têtard est euthanasié, il peut être retenu pour une analyse histopathologique, en fixant le spécimen préalablement à une analyse future.

*Morphométrie (poids et longueur)*

53. La caractérisation du poids humide et de la LMC (**figure 2b**) est identique à celle décrite pour les sous-échantillons de larves.

*VTG plasmatique (optionnel)*

54. La VTG est un biomarqueur largement accepté résultant de l'exposition à des produits chimiques œstrogéniques. En ce qui concerne le LADGA, la VTG plasmatique peut éventuellement être mesurée dans des échantillons de juvéniles (ce qui peut être particulièrement utile si le produit chimique testé est présumé être un œstrogène).

55. Les membres postérieurs des juvéniles euthanasiés sont sectionnés et le sang est prélevé au moyen d'un tube capillaire hépariné (bien que d'autres méthodes de prélèvement de sang, comme la ponction cardiaque, puissent convenir). Le sang est expulsé dans un tube de microcentrifugation (de 1.5 mL de volume, par exemple) et centrifugé pour obtenir le plasma. Les échantillons de plasma sont conservés à une température inférieure ou égale à -70 °C jusqu'à la détermination de la VTG. La VTG plasmatique peut être dosée par la méthode ELISA (annexe 6) ou par une autre méthode telle que la spectrométrie de masse (31). Les anticorps spécifiques de l'espèce sont préférables en raison de leur plus grande sensibilité.

*Détermination du sexe génétique*

56. Le sexe génétique de chaque grenouille juvénile est évalué d'après les marqueurs développés par Yoshimoto *et al.* (11). Pour déterminer le sexe génétique, une partie (ou la totalité) d'un membre postérieur (ou de tout autre tissu) retiré au moment de la dissection est prélevée et stockée dans un tube de microcentrifugation (des échantillons de tissus de grenouilles peuvent être obtenus à partir de n'importe quel tissu). Les tissus peuvent être conservés à une température inférieure ou égale à -20 °C jusqu'à l'isolement de l'acide désoxyribonucléique (ADN). L'isolement de l'ADN à partir de tissus peut être effectué au moyen de kits disponibles dans le commerce ; la présence ou l'absence du marqueur est analysée par le biais d'une réaction en chaîne par polymérase (PCR) (annexe 5). En règle générale, la concordance entre le sexe histologique et le génotype des animaux témoins au moment de l'échantillonnage des juvéniles dans les groupes témoins est supérieure à 95 %.

#### *Collecte et fixation des tissus pour l'histopathologie*

57. Les gonades, les conduits reproducteurs, les reins et les foies sont collectés à des fins d'analyse histologique lors de l'échantillonnage final. La cavité abdominale est ouverte, et le foie disséqué et pesé. Ensuite, les organes digestifs (estomac, intestins, etc.) sont soigneusement retirés de la partie inférieure de l'abdomen pour faire apparaître les gonades, les reins et les conduits reproducteurs. Les éventuelles anomalies morphologiques macroscopiques observées dans les gonades sont notées. Enfin, les membres postérieurs sont retirés s'ils ne l'ont pas déjà été pour le prélèvement du sang. Les foies collectés et la carcasse avec les gonades conservées *in situ* sont immédiatement placés dans du fixateur de Davidson. Le volume de fixateur dans le conteneur doit être supérieur ou égal à 10 fois le volume approximatif des tissus. Tous les tissus restent dans le fixateur de Davidson pendant au moins 48 heures, mais pas plus de 96 heures, après quoi ils sont rincés à l'eau désionisée et stockés dans du formol à 10 % neutre tamponné (1) (29).

#### *Histopathologie*

58. Chaque échantillon de juvéniles fait l'objet d'une évaluation histologique visant à déceler une pathologie dans les gonades, les conduits reproducteurs, les reins et les tissus hépatiques ; cette évaluation histologique permet de poser un diagnostic et d'évaluer l'indice de gravité (32). Le phénotype gonadique est aussi dérivé de cette évaluation (ovaires, testicules, hermaphrodisme, par exemple) ; couplées à la caractérisation du sexe génétique de chaque individu, ces observations peuvent servir à calculer les sex-ratios génotypiques/phénotypiques.

## **RAPPORT D'ÉTUDE**

#### *Analyse statistique*

59. Le LAGDA génère trois types de données à soumettre à l'analyse statistique : (1) des données quantitatives continues (poids, LMC, IHS, VTG), (2) des données de type « délai avant événement » concernant les rythmes de développement (nombre de jours jusqu'à l'atteinte du stade NF62 à compter du lancement de l'essai) et (3) des données ordinales sous la forme d'indices de gravité ou de stades de développement, issues des évaluations histopathologiques.

60. Il est recommandé de s'assurer que le protocole d'essai et le test statistique sélectionné ont une puissance suffisante pour permettre de déceler des changements d'importance biologique concernant les effets pour lesquels une CSEO ou une CEx doit être rapportée. Il est préférable d'effectuer ces analyses statistiques (en règle générale, sur la base de la moyenne des réplicats) en suivant les procédures décrites dans le document de l'OCDE sur les méthodes actuelles d'analyse des données d'écotoxicité (*Current*

*Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (33). L'annexe 7 de la présente ligne directrice illustre l'arbre de décision recommandé pour l'analyse statistique et donne des indications pour le traitement des données, permettant ainsi de choisir le test ou modèle statistique le plus approprié dans le LAGDA.

61. Les données issues des échantillons de juvéniles (croissance, IHS, par exemple) sont analysées pour chaque sexe génotypique séparément sachant que le sexe génotypique est déterminé pour toutes les grenouilles.

#### ***Considérations relatives à l'analyse des données***

##### *Utilisation de réplicats et de traitements compromis*

62. Une mortalité excessive due à une toxicité manifeste, une maladie ou une erreur technique peut compromettre les réplicats et traitements. Si un traitement est compromis par une maladie ou une erreur technique, trois traitements non compromis et trois réplicats non compromis devront être disponibles pour l'analyse. Si une toxicité manifeste est observée pour la/les dose(s) la/les plus forte(s), il est préférable qu'au moins trois niveaux de traitement avec trois réplicats non compromis soient disponibles pour l'analyse (conformément à l'approche de la concentration maximale tolérée appliquée dans les Lignes directrices pour les essais de l'OCDE (34). Outre la mortalité, les signes de toxicité manifeste peuvent inclure des effets comportementaux (animaux flottant à la surface, immobiles au fond du vivier, nage inversée ou irrégulière, manque d'activité à la surface, par exemple), des lésions morphologiques (lésions hémorragiques, œdème abdominal, par exemple) ou l'inhibition des réactions normales au régime alimentaire par rapport aux animaux témoins sur le plan qualitatif.

##### *Témoin avec solvant*

63. À la clôture de l'essai, les effets potentiels du solvant (en cas d'utilisation d'un solvant) font l'objet d'une évaluation. Pour cela, les résultats correspondant au groupe témoin avec solvant sont comparés à ceux du groupe témoin avec eau de dilution. Les relevés d'observation les plus pertinents dans ce cadre concernent les déterminants de la croissance (poids et longueur), qui peuvent être affectés en cas d'effets toxiques généralisés. Si des différences statistiquement significatives sont décelées entre les relevés d'observation du groupe témoin avec eau de dilution et ceux du groupe témoin avec solvant, un avis d'expert doit permettre de déterminer si la validité de l'essai est compromise. Si les deux témoins diffèrent, les témoins exposés au produit chimique sont comparés au témoin avec solvant, sauf si l'on sait qu'il est préférable de les comparer au témoin contenant l'eau de dilution. S'il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes témoins, il est recommandé de comparer les groupes exposés au produit chimique testé avec l'ensemble des deux groupes (témoin avec solvant + témoin avec eau de dilution), sauf si l'on sait qu'il est préférable de les comparer soit au groupe témoin avec eau de dilution soit au témoin avec solvant.

#### ***Rapport d'essai***

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

##### *Produit chimique testé :*

- État physique et, si nécessaire, propriétés physico-chimiques ;
- Substance mono-constituant :  
apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude ;

identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

- Substance multi-constituants, UVCB et mélanges :  
caractérisés autant que possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

### *Espèce soumise à l'essai :*

- nom scientifique, souche (si possible), origine, méthode de collecte des œufs fécondés et de manipulation ultérieure.
- incidence de la scoliose chez les témoins historiques en ce qui concerne la culture-mère utilisée.

### *Conditions d'essai :*

- photopériode(s) ;
- conception de l'essai (dimensions des récipients, matériel et volume d'eau, nombre de récipients et de réplicats, nombre d'organismes d'essai par réplicat, etc.) ;
- méthode de préparation des solutions-mères et fréquence de renouvellement (l'agent solubilisant et sa concentration doivent être indiqués le cas échéant) ;
- méthode de dosage du produit chimique testé : pompes doseuses, systèmes de dilution, etc.
- efficacité de récupération de la méthode et concentrations d'essai nominales, limite de quantification, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les récipients d'essai, méthode analytique utilisée et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations du produit chimique testé en solution vraie ;
- caractéristiques de l'eau de dilution : pH, dureté, température, concentration d'oxygène dissous, taux de chlore résiduel (si mesuré), iode total, carbone organique total (si mesuré), solides en suspension (si mesurés), salinité du milieu d'essai (si mesurée) et toute autre mesure effectuée ;
- concentrations d'essai nominales, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types ;
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, température (quotidiennement) et concentration d'oxygène dissous ;
- informations détaillées sur l'alimentation (type d'aliments, provenance, quantité distribuée et fréquence, etc.).

### *Résultats :*

- données attestant que les témoins répondent aux critères de validité ;
- données relatives au groupe témoin (plus témoin avec solvant le cas échéant) et aux groupes traités : mortalité et anomalies observées, délai jusqu'au stade NF62, histologie de la thyroïde (échantillon de larves uniquement), croissance (poids et longueur), IHS (échantillon de juvéniles uniquement), sex-ratios génotypiques/phénotypiques (échantillon de juvéniles uniquement), résultats de l'histopathologie des gonades, des conduits reproducteurs, des reins et du foie

(échantillon de juvéniles uniquement) et de la VTG plasmatique (échantillon de juvéniles uniquement, si mesurée) ;

- approche utilisée pour l'analyse statistique et le traitement des données (test ou modèle statistique utilisé) ;
- concentration sans effet observé (CSEO) pour chacune des réponses évaluées ;
- concentration minimale avec effet observé (CMEO) pour chacune des réponses évaluées (à  $\alpha = 0.05$ ) ; CEx pour chacune des réponses évaluées, le cas échéant, et intervalles de confiance (95 %, par exemple), graphique du modèle ajusté utilisé pour calculer la CEx, pente de la courbe concentration-réponse, formule du modèle de régression, estimation des paramètres du modèle et de leurs erreurs-types ;
- tout écart par rapport à la Ligne directrice et aux critères d'acceptation ; considérations relatives aux conséquences susceptibles d'en découler pour les résultats de l'essai.

65. En ce qui concerne les résultats de la mesure des effets, on présentera les valeurs moyennes et leurs écarts-types (par réplikat et par concentration, si possible).

66. Le délai médian jusqu'au stade NF62 dans les témoins est calculé et présenté comme la moyenne des médianes dans les réplicats et leur écart-type. De même, pour les traitements, une médiane est calculée et présentée comme la moyenne des médianes dans les réplicats et leur écart-type.

## Bibliographie

- 1) Agence pour la Protection de l'Environnement des États-Unis. (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- 2) OCDE. (2012)a. Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disruptors, l'Environnement, la Santé et la Sécurité, Série sur les Essais et Evaluations, (No. 150.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 3) Nieuwkoop PD et Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus Laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, États-Unis.
- 4) Kloas Wet Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disruptors. *Journal of Chromatography A* 1130: 16-27.
- 5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Journal of the Royal Society of Medicine* 93: 140-144.
- 6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus Laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 237: 1565.
- 7) Villalpando I et Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. *International Journal of Developmental Biology* 34: 281-285.
- 8) Miyata S, Koike S et Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Zoological Science* 16: 335-340.
- 9) Mikamo K et Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus Laevis*, Induced by Implanted Testes. *Genetics* 48: 1411.
- 10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis KK et Degitz SJ. (2009)a. Sex Reversal of the Amphibian, *Xenopus Tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. *Aquatic Toxicology* 91: 143-150.
- 11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T et Ito M. (2008). A W-linked DM-domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469-2474.
- 12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S et Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus Tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.
- 13) Tobias ML, Tomasson J et Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus Laevis*. *Journal of Neurobiology* 37: 441-448.

- 14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR et Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. *Aquatic Toxicology* 84: 321-327.
- 15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A et Degitz SJ. (2011). Effects of 4-Tert-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. *Aquatic Toxicology* 103: 159-169.
- 16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphie, PA, États-Unis.
- 17) OCDE (1992). Ready Biodegradability Test (No. 301). Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation de Coopération Economique et de Développement, Paris
- 18) OCDE (2014). Ready Biodegradability - CO<sub>2</sub> in sealed vessels (Headspace Test) (No. 310). Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation de Coopération Economique et de Développement, Paris
- 19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL et Hammermeister DE. (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. *Chemosphere* 39: 539-551.
- 20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere*, 86(6), pp.593-9.
- 21) OCDE. (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications l'Environnement, Santé et Sécurité, Série sur les Essais et Evaluations (No. 23.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ et Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Aquatic Toxicology* 76: 69-92.
- 23) ASTM. (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphie, PA, États-Unis.
- 24) Read BT. (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, Royaume-Uni., 84 pp.
- 25) OCDE. (2009). Essai de Métamorphose des Amphibiens, Lignes Directrices de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques, (No. 231.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 26) OCDE. (2012)b. Essai à Court Terme de Reproduction des Poissons, Lignes Directrices de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques, (No. 229.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 27) OCDE. (2011). Essai de Développement Sexuel des Poissons, Lignes Directrices de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques, (No. 234), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.

- 28) OCDE. (2013). Poisson, Essai de Toxicité Aiguë au Stade Embryonnaire, Lignes Directrices de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques, (No. 236.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 29) OCDE. (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology, Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Série sur les Essais et Evaluations, (No.82.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC et Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, *Toxicological Pathology* 37: 415-424.
- 31) Luna LG et Coady K. (2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Techniques* 5: (3): 194.
- 32) OECD (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Série sur les Essais et Evaluations (No.228), Organisation de Coopération Economique et de Développement, Paris.
- 33) OCDE. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Série sur les Essais et Evaluations (No. 54.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated Concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. *Aquatic Toxicology*;91(3), pp197-202.

ANNEXE 1

## DEFINITIONS

**Axe HHG** : axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique

**CEx** : (concentration efficace à x%) concentration qui engendre un effet de x % sur les organismes d'essai durant une période d'exposition déterminée, en comparaison avec un témoin. Par exemple, la CE50 est la concentration estimée produire un effet sur un paramètre évalué de l'essai dans 50 % d'une population exposée durant une période déterminée.

**Concentration létale médiane (CL50)** : concentration d'un produit chimique testé dont on estime qu'elle provoquera la mort de 50 % des organismes d'essai au cours de l'essai.

**Concentration minimale avec effet observé (CMEO)** : concentration la plus basse d'un produit chimique testé à laquelle on observe un effet statistiquement significatif (à  $p < 0.05$ ) par comparaison avec le témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO devraient avoir un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne sont pas réunies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO). L'annexe 7 donne des indications à ce sujet.

**Concentration sans effet observé (CSEO)** : concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO qui, par comparaison avec un témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à  $p < 0.05$ ), durant une période d'exposition déterminée.

**Effet apical** : effet se répercutant au niveau de la population.

**ELISA** : essai d'immuno-absorption enzymatique (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**Essai dynamique** : essai caractérisé par l'écoulement continu des solutions d'essai dans le système d'essai pendant la durée de l'exposition.

**IUPAC** : Union internationale pour la chimie pure et appliquée (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

**jpf** : jours post-fécondation

**SMILES** : Spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

**UVCB** : substances de composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou matériels biologiques.

**VTG** (vitellogénine) : phospholipoglycoprotéine précurseur des protéines du vitellus normalement produite par les femelles sexuellement actives de toutes les espèces ovipares.

ANNEXE 2

## QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

<b>Substance</b>	<b>Concentration limite</b>
Matière particulaire	5 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 plus polychlorobiphényles	50 ng/L
Chlore organique total	25 ng/L
Aluminium	1 µg/L
Arsenic	1 µg/L
Chrome	1 µg/L
Cobalt	1 µg/L
Cuivre	1 µg/L
Fer	1 µg/L
Plomb	1 µg/L
Nickel	1 µg/L
Zinc	1 µg/L
Cadmium	100 ng/L
Mercure	100 ng/L
Argent	100 ng/L

ANNEXE 3

## CONDITIONS D'ESSAI POUR LE TEST LAGDA

1. Espèce soumise à l'essai	<i>Xenopus laevis</i>
2. Type d'essai	Dynamique (flux continu)
3. Température de l'eau	La température nominale est de 21 °C. La température moyenne pendant toute la durée de l'essai est de 21 ± 1 °C (les différentiels interréplicat et intertraitement n'excèdent pas 1.0 °C)
4. Qualité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (à large spectre) 600-2000 lux (lumens/m <sup>2</sup> ) à la surface de l'eau
5. Photopériode	12 h de lumière pour 12 h d'obscurité
6. Volume de la solution d'essai et récipient d'essai (cuve)	4-10 L (profondeur de l'eau de 10–15 cm minimum) Cuve de verre ou d'acier inoxydable
7. Renouvellement de la solution d'essai, en volume	Constant, afin de garantir la stabilité des conditions biologiques et de l'exposition chimique (5 renouvellements du vivier par jour, par exemple)
8. Âge des organismes d'essai au démarrage	Stade 8-10 d'après Nieuwkoop et Faber (NF)
9. Nombre d'organismes par réplicat	20 animaux (embryons)/cuve (réplicat) au début de l'exposition puis 10 animaux (juvéniles)/cuve (réplicat) à partir du stade NF66 jusqu'à la fin de l'exposition
10. Nombre de traitements	Minimum de 4 traitements par le produit chimique testé plus témoin(s) approprié(s)
11. Nombre de réplicats par traitement	4 réplicats de par traitement contenant le produit chimique d'essai et 8 réplicats pour le(s) témoin(s)
12. Nombre d'organismes par concentration d'essai	Minimum de 80 animaux par traitement pour le produit chimique d'essai et minimum de 160 réplicats pour le(s) témoin(s)
13. Eau de dilution	Toute eau permettant la croissance et le développement normaux de <i>X. laevis</i> (eau de source ou eau du robinet filtrée sur charbon, par exemple)
14. Aération	Aucune aération exigée. L'aération des cuves peut néanmoins se révéler nécessaire si les niveaux d'oxygène dissous tombent en-deçà des limites recommandées et si le flux de solution d'essai est porté au maximum.
15. Oxygène dissous de la solution d'essai	Oxygène dissous : ≥ 40 % de la valeur de saturation en air ou ≥ 3.5 mg/L
16. pH de la solution d'essai	6.5-8.5 (les différentiels interréplicat et intertraitement n'excèdent pas 0.5)

- |                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 17. Dureté et alcalinité de la solution d'essai | 10-250 mg CaCO <sub>3</sub> /L                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 18. Régime alimentaire                          | (voir annexe 4)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 19. Période d'exposition                        | Du stade 8-10 jusqu'à dix semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le groupe témoin contenant l'eau de dilution et/ou le solvant (maximum 17 semaines)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 20. Effets biologiques mesurés                  | Mortalité (et anomalies morphologiques), délai jusqu'au stade NF62 (échantillon de larves), histologie de la thyroïde (échantillon de larves), croissance (poids et longueur), indice hépato-somatique (échantillon de juvéniles), sex-ratios génotypiques/phénotypiques (échantillon de juvéniles), histopathologie des gonades, des conduits reproducteurs, des reins et du foie (échantillon de juvéniles) et vitellogénine plasmatique (échantillon de juvéniles, optionnel)                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 21. Critères de validité de l'essai             | Concentration d'oxygène dissous > 40 % de la valeur de saturation en air ; température moyenne de l'eau de 21 ± 1 °C et différentiels interréplicat et intertraitement < 1.0 °C ; pH de la solution d'essai entre 6.5 et 8.5 ; mortalité dans le témoin ≤ 20 % dans chaque réplicat, et délai moyen jusqu'au stade NF62 dans le témoin ≤ 45 jours ; poids moyen des organismes d'essai au stade NF62 et à la fin de l'essai dans les témoins et les témoins avec solvant (si un solvant est utilisé) de 1.0 ± 0.2 et 11.5 ± 3 g, respectivement ; les données disponibles démontrent que la concentration du produit chimique testé en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées. |

**ANNEXE 4****RÉGIME ALIMENTAIRE**

Il convient de noter que, bien que ce régime alimentaire soit recommandé, d'autres régimes sont autorisés à condition qu'ils permettent aux organismes d'essai de croître et de se développer à un rythme approprié.

**Alimentation des larves**

Préparation des aliments à administrer aux larves

- A. 1:1 (v/v) nourriture de départ pour truites:algues/TetraFin® ou équivalent ;
1. Nourriture de départ pour truites : mixer 50 g de nourriture de départ pour truites (fines granules ou poudre) avec 300 mL d'eau filtrée appropriée dans un broyeur à grande vitesse pendant 20 secondes
  2. Mélange algues/TetraFin® (ou équivalent) : mixer 12 g de disques de spiruline avec 500 mL d'eau filtrée appropriée dans un broyeur à grande vitesse pendant 40 secondes, mixer 12 g de Tetrafin® avec 500 mL d'eau filtrée puis mélanger le tout afin d'obtenir 1 L à raison de 12 g/L de disques de spiruline et de 12 g/L de Tetrafin®
  3. Mélanger à proportions égales la nourriture de départ pour truites mixée et le mélange algues/TetraFin®

B. Artémies :

Faire éclore 15 mL d'œufs d'artémia dans 1 L d'eau salée (préparée en ajoutant 20 mL de NaCl à 1 L d'eau désionisée). Après aération pendant 24 heures à température ambiante sous une lumière constante, les artémies sont collectées. L'arrêt de l'aération permet aux artémies de se déposer brièvement pendant 30 minutes. Les kystes flottant à la surface de la boîte sont retirés et jetés, puis les artémies sont filtrées de manière appropriée et plongées dans 30 mL d'eau filtrée.

Protocole alimentaire

Le **tableau 1** illustre le type et la quantité d'aliments administrés aux larves pendant toute la durée de l'exposition. Les animaux sont nourris trois fois par jour du lundi au vendredi et une fois par jour le week-end.

**Tableau 1.** Régime alimentaire des larves de *X. laevis* dans des conditions d'essai dynamique

Temps* (post-fécondation)	Nourriture de départ pour truites:algues/TetraFin®		Artémies	
	Semaine (3 fois par jour)	Week-end (1 fois par jour)	Semaine (2 fois par jour)	Week-end (1 fois par jour)
J4-14 (des semaines 0-1)	0.33 mL	1.2 mL	0.5 mL (J8-15)	0.5 mL (J8-15)
semaine 2	0.67 mL	2.4 mL	1 mL (à partir de J16)	1 mL (à partir de J16)
semaine 3	1.3 mL	4.0 mL	1 mL	1 mL
semaine 4	1.5 mL	4.0 mL	1 mL	1 mL
semaine 5	1.6 mL	4.4 mL	1 mL	1 mL
semaine 6	1.6 mL	4.6 mL	1 mL	1 mL
semaine 7	1.7 mL	4.6 mL	1 mL	1 mL
semaines 8-10	1.7 mL	4.6 mL	1 mL	1 mL

\* Le jour 0 correspond au jour de l'injection de hCG.

Changement de régime alimentaire entre le stade larvaire et le stade juvénile

Une fois métamorphosées, les larves se voient administrer le régime alimentaire pour juvéniles décrit ci-dessous. Pendant la transition, les rations administrées aux larves sont réduites proportionnellement à l'augmentation de celles administrées aux juvéniles dans chaque groupe de cinq têtards dépassant le stade NF62 et sur le point d'achever leur métamorphose (stade NF66).

Alimentation des juvénilesRégime alimentaires des juvéniles

Une fois la métamorphose achevée (stade NF66), le régime alimentaire change : seuls des aliments de premier choix pour amphibiens de type 3/32 pouces (Xenopus Express, FL, États-Unis), ou équivalent, sont administrés.

Préparation de granulés broyés pour la transition entre le stade larvaire et le stade juvénile

Les granulés pour amphibiens sont broyés brièvement dans un moulin à café ou un mixeur ou bien écrasés dans un mortier avec un pilon afin que leur taille soit réduite d'environ un tiers. Un broyage trop long, entraînant la transformation des granulés en poudre, est déconseillé.

*Protocole alimentaire*

Le **tableau 2** illustre le type et la quantité d'aliments administrés aux juvéniles et aux adultes. Les animaux sont nourris une fois par jour. Il convient de noter que lors de leur métamorphose, les animaux continuent de se voir administrer une partie des artémies jusqu'à métamorphose complète de plus de 95 % des animaux.

Les animaux ne sont pas nourris le jour de la fin de l'essai afin que les aliments ne faussent pas les mesures de poids.

**Tableau 2.** Régime alimentaire des juvéniles de *X. laevis* dans des conditions d'essai dynamique. Il convient de noter que les animaux non métamorphosés, y compris ceux dont la métamorphose a été retardée par le traitement chimique, ne peuvent pas manger de granulés non broyés.

<b>Temps*</b> <b>(semaines qui suivent la date médiane de métamorphose)</b>	<b>Volume de granulés broyés</b> <b>(mg par jeune grenouille)</b>	<b>Volume total de granulés</b> <b>(mg par jeune grenouille)</b>
Lors de la métamorphose des animaux	25	0
semaines 0-1	25	28
semaines 2-3	0	110
semaines 4-5	0	165
semaines 6-9	0	220

\* Le premier jour de la semaine 0 correspond à la date médiane de métamorphose des animaux témoins.

ANNEXE 5**DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE (SEXAGE GÉNÉTIQUE)**

La méthode de sexage génétique chez *Xenopus laevis* est inspirée des travaux de Yoshimoto *et al.*, 2008. Les procédures de génotypage détaillées peuvent être obtenues en consultant cette publication, si nécessaire. Il est possible d'employer des méthodes de substitution (PCR quantitative à haut débit, par exemple) si cela est jugé approprié.

**Amorces de X. laevis**Marqueur DM-W

Sens : 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Antisens : 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

Témoin positif

Sens : 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Antisens : 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

**Purification de l'ADN**

Purifier l'ADN extrait de tissus musculaires ou cutanés au moyen du kit *Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit* (cat # 69506), par exemple, ou d'un produit similaire selon les instructions du kit. L'ADN peut être élué des colonnes de centrifugation en utilisant moins de tampon, ce qui permet d'obtenir des échantillons plus concentrés si cela est jugé nécessaire pour la PCR. Notons que l'ADN est assez stable et qu'il convient donc de veiller à éviter toute contamination croisée qui pourrait entraîner une mauvaise caractérisation des mâles et des femelles.

**PCR**

Le **tableau 1** présente un exemple de protocole utilisant JumpStart™ Taq de Sigma.

**Tableau 1** Exemple de protocole utilisant JumpStart™ Taq de Sigma

Mélange maître	1x (µL)	[Final]
Eau stérile exempte de nucléase	11	-
Tampon 10X	2.0	-
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2.0	2.5 mM
dNTP (10mM chacun)	0.4	200 µM
Marqueur amorce sens (8 µM)	0.8	0.3 µM
Marqueur amorce anti-sens (8 µM)	0.8	0.3 µM
Témoin amorce sens (8 µM)	0.8	0.3 µM

# LD241

# OECD/OCDE

Témoin amorce antisens (8 µM)	0.8	0.3 µM
JumpStart™ Taq	0.4	0.05 unités/µL
Matrice d'ADN	1.0	~200 pg/µL

Note : Lors de la préparation des mélanges maîtres, préparer une quantité de mélange supérieure à la quantité souhaitée pour compenser les pertes pouvant se produire durant le pipetage (utiliser 25x pour 24 réactions seulement, par exemple).

## Réaction :

Mélange maître 19.0 µL  
Matrice 1.0 µL  
Total 20.0 µL

## Profil du thermocycleur :

Étape 1. 94 °C 1 min  
Étape 2. 94 °C 30 sec  
Étape 3. 60 °C 30 sec  
Étape 4. 72 °C 1 min  
Étape 5. Aller à l'étape 2. 35 cycles  
Étape 6. 72 °C 1 min  
Étape 7. Maintenir à 4 °C

Les produits PCR peuvent être placés immédiatement dans un gel ou conservés à 4 °C.

## Électrophorèse sur gel d'agarose (3 %)

### TAE 50X

Tris 24.2 g  
Acide acétique glacial 5.71 mL  
Na<sub>2</sub> (EDTA)·2H<sub>2</sub>O 3.72 g  
Ajouter de l'eau jusqu'à 100 mL

### TAE 1X

H<sub>2</sub>O 392 mL  
TAE 50X 8 mL

### 3:1 Agarose

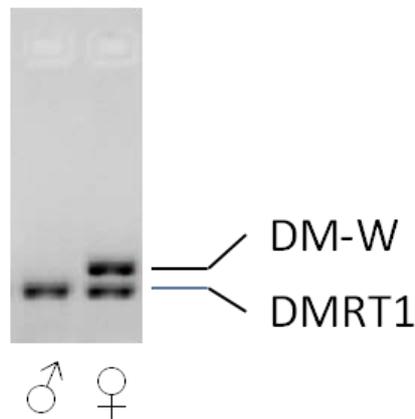
3 parties d'agarose NuSieve™ GTG™  
1 partie d'agarose de Fisher à électroendosmose (EEO) faible

## Méthode

1. Préparer un gel 3 % en ajoutant 1.2 g du mélange d'agarose à 43 mL de TAE 1X. Agiter afin de fragmenter les agrégats.

2. Faire chauffer le mélange d'agarose au micro-ondes pendant 2 minutes jusqu'à sa dissolution complète (en évitant de le laisser déborder). Laisser refroidir légèrement.
3. Ajouter 1.0 µL de bromure d'éthidium (10 mg/mL). Agiter le flacon. Le bromure d'éthidium étant un produit mutagène, il est possible de le remplacer par d'autres produits à cette étape afin de réduire au maximum les risques pour la santé des travailleurs.
4. Verser le gel dans un moule avec un peigne. Laisser refroidir complètement.
5. Ajouter le gel dans l'appareil. Recouvrir le gel de TAE 1X.
6. Ajouter 1 µL de 6x colorant de dissociation à chaque volume de 10 µl de produit PCR.
7. Transférer les échantillons à la pipette dans les puits.
8. Effectuer l'électrophorèse à 160 V constants pendant ~20 minutes.

La **figure 1** présente une image de gel d'agarose montrant des profils de bandes indicatifs d'un individu mâle et d'un individu femelle.



**Figure 1.** Image de gel d'agarose montrant le profil de bande indicatif d'un individu mâle (♂) (une bande à ~203 bp: DMRT1) et d'un individu femelle (♀) (deux bandes à ~259 bp: DM-W et 203 bp:DMRT1).

### **Bibliographie**

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469-2474.

ANNEXE 6

## DOSAGE DE LA VITELLOGÉNINE

La vitellogénine (VTG) est dosée suivant une méthode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) prévue à l'origine pour la VTG des tête-de-boule (Parks *et al.*, 1999). Il n'existe actuellement pas d'anticorps disponibles dans le commerce pour *X. laevis*. Toutefois, étant donné l'abondance des informations relatives à cette protéine et la disponibilité de services commerciaux de production d'anticorps d'un bon rapport qualité-prix, on peut raisonnablement supposer que les laboratoires peuvent facilement développer un test ELISA pour effectuer ce dosage (Olmstead *et al.*, 2009). Olmstead *et al.* (2009) fournissent également une description de l'essai, modifié pour la VTG de *X. tropicalis*, présenté ci-dessous. La méthode utilise un anticorps produit en réaction à la VTG de *X. tropicalis*, mais également connu pour reconnaître la VTG de *X. laevis*. Il convient de noter que des tests ELISA non concurrentiels peuvent également être utilisés, et qu'ils peuvent avoir des limites de détection inférieures à celles de la méthode décrite ci-dessous.

Matériel et réactifs

- Sérum contenant le 1<sup>er</sup> anticorps (Ac) préadsorbé  
Mélanger 1 mesure de sérum contenant le 1<sup>er</sup> anticorps anti-VTG de *X. tropicalis* à 2 mesures de plasma de mâles issus du groupe témoin puis laisser reposer à température ambiante pendant ~ 75 minutes, placer sur de la glace pendant 30 min, centrifuger à plus de 20K x G pendant 1 heure à 4 °C, retirer le surnageant, aliquoter et conserver à -20 °C.
- 2<sup>e</sup> anticorps  
Conjugué IgG de chèvre anti-lapin-peroxydase de raifort (HRP) (Bio-Rad 172-1019, par exemple)
- Étalon de VTG  
VTG purifiée de *X. laevis* à 3.3 mg/mL.
- TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) (KPL 50-76-00 ; Sigma T0440, par exemple)
- Sérum de chèvre (NGS) (Chemicon S26-100mL, par exemple)
- Plaques de microtitration 96 puits en polystyrène EIA (ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35, par exemple)
- Four à hybridation à 37 °C (ou incubateur à air à équilibrage rapide) pour plaques, bain-marie pour tubes
- Autres équipements, produits chimiques et ressources couramment utilisés en laboratoire.

Recettes

- Tampon de revêtement (50 mM de tampon carbonate, pH 9.6) :

NaHCO <sub>3</sub>	1.26 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.68 g
eau	428 mL
- PBS 10X (0.1 M de phosphate, 1.5 M de NaCl) :

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.83 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	20.1 g

- |      |        |
|------|--------|
| NaCl | 71 g   |
| eau  | 810 mL |
- Tampon de lavage (PBST) :

PBS 10X	100 mL
eau	900 mL

Rééquilibrer le pH à 7.3 avec 1 M de HCl, puis ajouter 0.5 mL de Tween-20
  - Tampon d'essai :

Sérum de chèvre (NGS)	3.75 mL
Tampon de lavage	146.25 mL

### Prélèvement des échantillons

Le sang est collecté au moyen d'un tube capillaire hépariné pour micro-hématocrites puis placé sur de la glace. Après centrifugation pendant 3 minutes, le tube est marqué, ouvert, et le plasma expulsé dans des tubes de centrifugation de 0.6 mL contenant 0.13 unité d'aprotinine lyophilisée. (Ces tubes sont préparés à l'avance par ajout de la quantité appropriée d'aprotinine, congélation et lyophilisation dans un concentrateur à vide à faible température jusqu'à séchage complet.) Enfin, le plasma est conservé à -80 °C jusqu'à l'analyse.

### Procédure pour une plaque

#### Revêtement de la plaque

Mélanger 20 µL de VTG purifiée à 22 mL de tampon carbonate (concentration finale 3 µg/mL). Verser 200 µL du mélange dans chaque puits d'une plaque 96 puits. Recouvrir la plaque d'un film d'étanchéité adhésif et laisser incuber à 37 °C pendant 2 heures (ou à 4 °C pendant une nuit).

#### Blocage de la plaque

Préparer la solution de blocage en ajoutant 2 mL de sérum de chèvre (NGS) à 38 mL de tampon carbonate. Retirer la solution de revêtement puis égoutter en secouant. Verser 350 µL de la solution de blocage dans chaque puits. Recouvrir la plaque d'un film d'étanchéité adhésif et laisser incuber à 37 °C pendant 2 heures (ou à 4 °C pendant une nuit).

#### Préparation des solutions étalons

Mélanger 5.8 µL d'étalon de VTG purifiée à 1.5 mL de tampon d'essai dans un tube à essai en verre borosilicaté à usage unique (12 x 75 mm). On obtient ainsi 12 760 ng/mL de solution. Préparer ensuite une dilution en série en ajoutant 750 µL de la dilution précédente à 750 µL de tampon d'essai pour obtenir des concentrations finales de 12 760, 6 380, 3 190, 1 595, 798, 399, 199, 100 et 50 ng/mL.

#### Préparation des échantillons

Commencer par une dilution au 1/300 (1 µL de plasma mélangé à 299 µL de tampon d'essai, par exemple) ou au 1/30 du plasma dans le tampon d'essai. Si l'on souhaite obtenir une grande quantité de VTG, il pourra être nécessaire de procéder à des dilutions supplémentaires ou à la dilution de plus grandes quantités. S'efforcer de maintenir la valeur de B/B<sub>0</sub> dans la gamme d'étalonnage. En ce qui concerne les échantillons sans VTG appréciable tels que les mâles et les femelles du groupe témoin (qui sont tous

immatures), utiliser le rapport de dilution 1/30. Les échantillons moins dilués peuvent induire des effets de matrice non désirés.

En outre, il est recommandé d'analyser un échantillon témoin positif sur chaque plaque. Cet échantillon provient d'un pool de plasma contenant des niveaux élevés de VTG. Le pool de plasma est d'abord dilué dans du sérum de chèvre (NGS), aliquoté puis conservé à -80 °C. Pour chaque plaque, un aliquot est décongelé, dilué dans un tampon d'essai et analysé comme un échantillon d'essai.

#### Incubation avec le 1<sup>er</sup> anticorps

Préparer le premier anticorps en diluant au 1/2 000 du sérum contenant le 1<sup>er</sup> anticorps préadsorbé dans le tampon d'essai (de 8 µL à 16 mL de tampon d'essai, par exemple). Mélanger 300 µL de la solution contenant le 1<sup>er</sup> anticorps avec 300 µL d'échantillon/étalon dans un tube en verre. Préparer le tube de B<sub>0</sub> suivant la même procédure avec 300 µL de tampon d'essai et 300 µL d'anticorps. De plus, préparer un tube LNS contenant exclusivement 600 µL de tampon d'essai (donc sans anticorps). Recouvrir les tubes de Parafilm puis agiter doucement les tubes au vortex. Incuber dans un bain-marie à 37 °C pendant 1 heure.

#### Lavage de la plaque

Laver la plaque juste avant la fin de l'incubation du premier anticorps. Pour ce faire, secouer la plaque pour la vider de son contenu sur du papier absorbant puis sécher en tamponnant. Ensuite, remplir les puits de 350 µL de solution de lavage, vider et sécher en tamponnant. Une pipette à répétition multicanaux ou un laveur de plaques sont utiles à ce stade. Renouveler le lavage deux fois, ce qui fait trois lavages au total.

#### Chargement de la plaque

Une fois la plaque lavée, retirer les tubes du bain-marie puis agiter doucement les tubes au vortex. Ajouter 200 µL de chaque tube d'échantillon, d'étalon, de B<sub>0</sub> et de LNS pour doubler les puits de la plaque. Recouvrir la plaque d'un film d'étanchéité adhésif et laisser incuber pendant 1 heure à 37 °C.

#### Incubation avec le 2<sup>e</sup> anticorps

À la fin de l'incubation de l'étape précédente, laver de nouveau la plaque trois fois, comme décrit précédemment. Préparer le deuxième anticorps dilué en mélangeant 2.5 µL du deuxième anticorps à 50 mL du tampon d'essai. Verser 200 µL du deuxième anticorps dilué dans chaque puits, étanchéifier comme précédemment puis incuber pendant 1 heure à 37 °C.

#### Ajout d'un substrat

Une fois achevée l'incubation avec le deuxième anticorps, laver la plaque trois fois, comme décrit précédemment. Verser ensuite 100 µL de substrat TMB dans chaque puits. Patienter pendant 10 minutes (temps de réaction) après avoir placé le mélange de préférence à l'abri d'une source de lumière vive. Interrompre la réaction en ajoutant 100 µL d'acide phosphorique 1 M. Le mélange change alors de couleur, passant du bleu à un jaune intense. Mesurer l'absorbance à 450 nm au moyen d'un lecteur de plaques.

#### Calcul de B/B<sub>0</sub>

Soustraire la valeur LNS moyenne de tous les mesurages. Calculer la B/B<sub>0</sub> de chaque échantillon et de chaque étalon en divisant la valeur d'absorbance (B) par l'absorbance moyenne de l'échantillon B<sub>0</sub>.

#### Réalisation de la courbe d'étalonnage et détermination des quantités inconnues

Générer une courbe d'étalonnage à l'aide d'un logiciel de création de graphiques (Slidewrite ou Sigma Plot<sup>®</sup>, par exemple) qui extrapolera la quantité de B/B<sub>0</sub> de l'échantillon à partir de la B/B<sub>0</sub> des solutions étalons. Habituellement, la quantité est représentée sur une échelle logarithmique, et la courbe est de forme sigmoïde. Toutefois, elle peut apparaître linéaire si la gamme d'étalonnage utilisée est étroite. Corriger les quantités d'échantillon en fonction du facteur de dilution et consigner en mg de VTG/mL de plasma.

#### **Détermination des seuils minimaux de détection**

Souvent, en particulier chez les mâles normaux, il n'est pas évident de savoir comment consigner les résultats obtenus pour des valeurs faibles. Dans ces cas, un intervalle de confiance à 95 % est utilisé pour déterminer s'il faut indiquer une valeur « zéro » ou un autre chiffre. Si le résultat de l'échantillon est compris dans l'intervalle de confiance de l'étalon zéro (B<sub>0</sub>), il faut lui attribuer la valeur « zéro ». Le seuil minimal de détection correspondra à l'étalon le plus bas qui est systématiquement différent de l'étalon zéro ; autrement dit, les deux intervalles de confiance ne se chevauchent pas. Si le résultat de l'échantillon se situe à l'intérieur ou au-dessus de l'intervalle de confiance du seuil minimal de détection, la valeur calculée sera notée. Si un échantillon est compris entre l'étalon zéro et les intervalles du seuil minimal de détection, la moitié du seuil minimal de détection est notée en ce qui concerne la valeur de cet échantillon.

#### **BIBLIOGRAPHIE**

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.

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: Toxicology & Pharmacology* 123: 113-125.

ANNEXE 7

## ANALYSE STATISTIQUE

Le LAGDA génère trois types de données à soumettre à l'analyse statistique : (1) des données quantitatives continues, (2) des données de type « délai avant événement » concernant les rythmes de développement (temps écoulé jusqu'à l'atteinte du stade NF62, (3) des données ordinales (indices de gravité ou stades de développement) issues des évaluations histopathologiques. La **figure 1** représente l'arbre de décision recommandé pour l'analyse statistique des données du LAGDA. Des indications utiles pour réaliser cette analyse sont fournies ci-après. En ce qui concerne l'arbre de décision, les valeurs obtenues pour la mortalité, la croissance (poids et longueur) et l'indice hépato-somatique (IHS) sont analysées dans la branche « autres paramètres ».

Données continues

Dans un premier temps, on vérifie si les données issues des relevés d'observation continus sont monotones en les transformant en rangs, puis en procédant à une analyse de variance (ANOVA) et en comparant les contrastes linéaires et quadratiques. Si les données se révèlent monotones, il convient d'appliquer le test de Jonckheere-Terpstra aux médianes des répliqués, et aucune autre analyse n'est menée ultérieurement. S'il s'agit de données à distribution normale et à variances homogènes, le test de Williams est également envisageable. Si les données se révèlent non monotones (contraste quadratique significatif et contraste linéaire non significatif), il convient de les analyser à l'aide d'un modèle ANOVA à effets mixtes. On vérifie ensuite si les données suivent une loi normale ou non (de préférence en procédant au test de Shapiro-Wilk ou à celui d'Anderson-Darling) et si leurs variances sont homogènes (de préférence à l'aide du test de Levene). Les deux tests sont appliqués aux résidus du modèle ANOVA à effets mixtes. Quoique préférables, ces tests formels de normalité et d'homogénéité peuvent être remplacés par le recours à l'avis d'experts. Si les valeurs présentent une distribution normale et des variances homogènes, les hypothèses d'un modèle d'ANOVA à effets mixtes sont vérifiées et le test de Dunnett permet de dégager les effets significatifs du traitement. En cas de non-normalité ou d'hétérogénéité de la variance, les hypothèses du test de Dunnett ne sont plus respectées et on essaie de transformer les données pour obtenir leur distribution normale et stabiliser la variance. Si aucune transformation de ce type n'est trouvée, on détermine alors les effets significatifs du traitement à l'aide du test de Dunn. Chaque fois que possible, il y a lieu de pratiquer un test unilatéral plutôt que bilatéral, mais il est nécessaire de se fonder sur l'avis d'experts pour déterminer quel test est adapté à tel ou tel effet mesuré.

Mortalité

Les données relatives à la mortalité sont analysées pendant toute la durée de l'essai et sont exprimées en proportions de décès dans un vivier particulier. Les têtards qui ne se métamorphosent pas complètement dans le délai imparti, les têtards qui font partie de la cohorte de sous-échantillons de larves, les grenouilles juvéniles qui sont sélectionnées ainsi que tout décès dû à une erreur expérimentale sont traités comme des données censurées et ne figurent pas au dénominateur du rapport qui détermine le pourcentage. Avant toute analyse statistique, les proportions de décès font l'objet d'une transformation arc-sinus de la racine carrée. Il est également possible d'utiliser le test de Cochran-Armitage, éventuellement avec correction de type Rao-Scott en cas de surdispersion.

Poids et longueur (données relatives à la croissance)

Les mâles et les femelles n'étant pas sexuellement dimorphes pendant la métamorphose, il convient d'analyser les données relatives à la croissance des larves indépendamment du sexe. En revanche, les données relatives à la croissance des juvéniles sont analysées séparément en fonction du sexe génétique. Une transformation logarithmique peut se révéler nécessaire pour ces relevés d'observation dans la mesure où il n'est pas rare que les données relatives à la taille suivent une loi log normale.

#### Indice hépato-somatique (IHS)

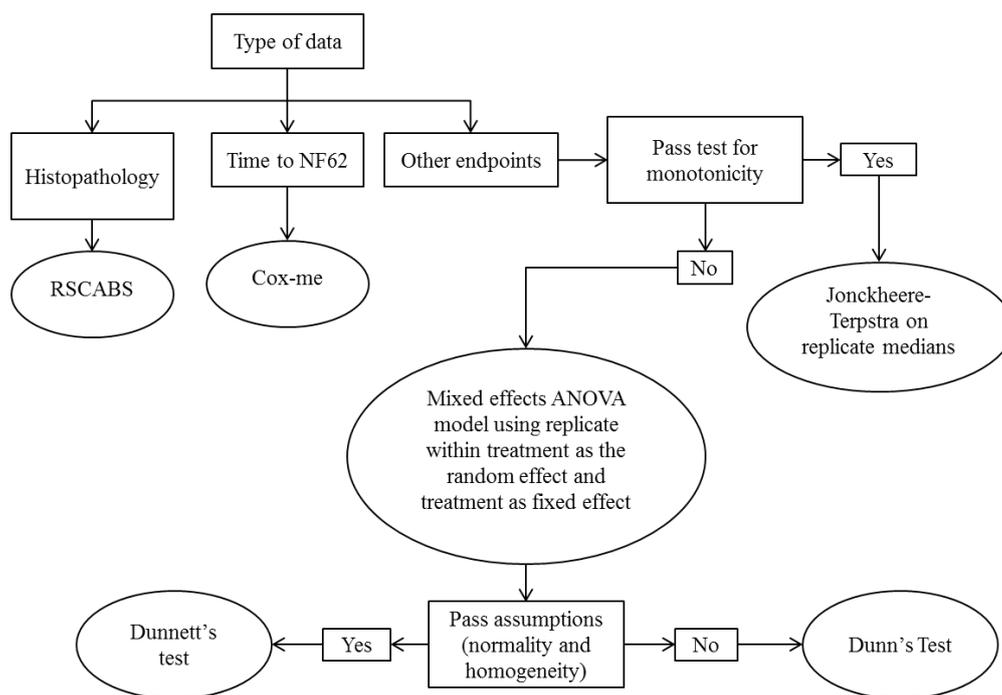
Les valeurs relatives au poids du foie sont normalisées par rapport au poids du corps entier (ce qui donne l'IHS) et analysées séparément en fonction du sexe génétique.

#### Délai jusqu'au stade NF62

Les données relatives au temps écoulé jusqu'à la métamorphose sont traitées comme des données de type « délai avant événement » ; les décès ou individus n'atteignant pas le stade NF62 en 70 jours sont traités comme des données censurées à droite (la valeur réelle est supérieure à 70 jours, mais l'étude se termine avant que les animaux aient atteint le stade NF62 en 70 jours). Le délai médian jusqu'au stade NF62, qui correspond à l'achèvement de la métamorphose dans les témoins avec eau de dilution, est utilisé pour déterminer la date de la fin de l'essai. Le délai médian jusqu'à la fin de la métamorphose peut être déterminé par l'estimateur produit-limite de Kaplan-Meier. Il convient d'analyser ce relevé d'observation à l'aide du modèle à risques proportionnels de Cox à effets mixtes, qui tient compte de la structure des réplicats à l'essai.

#### Données histopathologiques (indices de gravité et stades de développement)

Les données histopathologiques prennent la forme d'indices de gravité ou de stades de développement. Un test de tendance de Cochran-Armitage avec correction de type Rao-Scott (RSCABS, *Rao-Scott-Cochran-Armitage by Slices*) est appliqué à chaque niveau de gravité dans une réponse histopathologique (Green *et al.*, 2014). La correction de type Rao-Scott permet que le plan d'expérience retenu pour les réplicats soit pris en compte dans l'essai. La procédure RSCABS est dite « par tranches » car elle prend en compte la prévision biologique selon laquelle l'effet tend à s'aggraver à mesure que la dose ou la concentration augmente, tout en conservant les scores des individus et en indiquant la gravité des effets détectés. Elle permet de déterminer quels traitements sont statistiquement différents des témoins (c'est-à-dire ceux qui comptent des pathologies plus graves que les témoins), mais aussi à quel indice de gravité cette différence apparaît, et ainsi de placer l'analyse dans un contexte, ce qui est indispensable. Pour ce qui est de déterminer le stade de développement des gonades et des conduits reproducteurs, il convient de soumettre les données à une manipulation supplémentaire car l'une des hypothèses retenues pour le test RSCABS est que la gravité de l'effet augmente avec la dose. L'effet observé peut correspondre à un retard de développement ou à une accélération du développement. D'où la nécessité d'analyser les données relatives au stade de développement comme indiqué afin de détecter une éventuelle accélération du développement, puis de les inverser manuellement avant de procéder à une deuxième analyse en vue de détecter un éventuel retard de développement.



Type of date	Type de données
Histopathology	Histopathologie
RSCABS	RSCABS
Time to NF62	Délai jusqu'au stade NF62
Cox-me	Modèle de Cox
Other endpoints	Autres effets mesurés
Pass test for monotonicity	Test de monotonie réussi
Jonckheere-Terpstra on replicate medians	Application du test de Jonckheere-Terpstra aux médianes des réplicats
Mixed effects ANOVA model using replicate within treatment as the random effect and treatment as fixed effect	Modèle ANOVA à effets mixtes utilisant le réplicat du traitement pour l'effet aléatoire et le traitement pour l'effet fixe
Pass assumptions (normality and homogeneity)	Hypothèses vérifiées (normalité et homogénéité)
Dunnett's test	Test de Dunnett
Dunn's test	Test de Dunn

Figure 1. Arbre de décision pour l'analyse statistique des données du LAGDA

**Bibliographie**

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1108-1116.

**ANNEXE 8****ÉLÉMENTS À PRENDRE EN COMPTE POUR LE SUIVI ET  
LA RÉDUCTION AU MINIMUM DE LA FRÉQUENCE DE LA SCOLIOSE**

La scoliose idiopathique, qui se manifeste habituellement par une « queue repliée » chez les têtards de *Xenopus laevis*, peut compliquer les observations morphologiques et comportementales dans les populations d'essai. On s'efforcera de réduire au minimum la fréquence de la scoliose voire de l'éliminer, à la fois dans les stocks et dans les conditions expérimentales. Dans l'essai définitif, il est recommandé que la prévalence de la scoliose modérée et grave soit inférieure à 10 %, afin de renforcer la confiance dans la capacité de l'essai à détecter des effets sur le développement liés au traitement chez des larves d'amphibiens par ailleurs en bonne santé.

Les observations quotidiennes effectuées au cours de l'essai définitif permettent d'enregistrer à la fois l'incidence (nombre d'individus) et la sévérité de la scoliose, si présente. La nature de l'anomalie doit être décrite par rapport à sa localisation (antérieure ou postérieure au cloaque, par exemple) et au sens de la courbure (latérale ou dorso-ventrale, par exemple). La gravité peut être classée comme suit :

(NR) non remarquable : absence de courbure

(1) minime : légère courbure latérale postérieure au cloaque ; apparente au repos uniquement

(2) modérée : courbure latérale postérieure au cloaque; visible en permanence mais n'empêchant pas le mouvement

(3) grave : courbure latérale antérieure au cloaque ; OU toute courbure empêchant le mouvement ;  
OU toute courbure dorso-ventrale

Un comité consultatif scientifique de l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (U.S. EPA) sur la loi FIFRA (FIFRA SAP 2013) a examiné les données récapitulatives sur la scoliose issues de quinze essais de métamorphose des amphibiens avec *X. laevis* (stade 51-60+) et a formulé des recommandations générales visant à réduire la prévalence de cette anomalie dans les populations d'essai. Ces recommandations s'appliquent au LAGDA même si cet essai implique un calendrier de développement plus long.

**Données historiques relatives au frai**

En règle générale, des adultes en bonne santé et de qualité supérieure sont utilisés comme couples reproducteurs ; l'élimination des couples reproducteurs dont la progéniture présente une scoliose peut atténuer l'apparition de cette pathologie au fil du temps. Plus précisément, il y a sans doute lieu de recourir le moins possible à des couples reproducteurs capturés dans la nature. La période d'exposition du LAGDA commence avec des embryons au stade 8-10, et il n'est pas possible de savoir, au début de l'essai, si les individus en question présenteront une scoliose. Ainsi, outre le suivi de l'incidence de la scoliose chez les animaux utilisés pour l'essai, les données historiques relatives à la ponte (y compris la prévalence de la scoliose chez les larves autorisées à se développer) doivent être notées. Il peut être utile de continuer à surveiller la portion de chaque ponte non utilisée dans une étude donnée et de rendre compte de ces observations (FIFRA SAP 2013).

### Qualité de l'eau

Il importe de veiller à la qualité de l'eau, à la fois dans le stock du laboratoire et pendant l'essai. Outre les critères de qualité de l'eau régulièrement évalués pour les essais de toxicité aquatique, il peut être utile de surveiller et de corriger les éventuelles carences nutritionnelles (carence en vitamine C, calcium ou phosphore, par exemple) ou des niveaux excessifs de sélénium et de cuivre, sachant que ces éléments peuvent provoquer une scoliose à des degrés divers chez les espèces *Rana* et *Xenopus* élevées en laboratoire. (Marshall *et al.* 1980 ; Leibovitz *et al.* 1992 ; Martinez *et al.* 1992 ; FIFRA SAP 2013). La mise en place d'un régime alimentaire approprié (voir **annexe 4**) et le nettoyage régulier des viviers permettront généralement d'améliorer la qualité de l'eau et la santé des spécimens d'essai.

### Régime alimentaire

Les recommandations spécifiques en matière de régime alimentaire, jugées efficaces dans le cadre du LAGDA, sont détaillées à l'**annexe 4**. Il est recommandé de contrôler la présence dans les aliments de toxines biologiques, d'herbicides et d'autres pesticides, qui sont connus pour provoquer la scoliose chez *X. laevis* et d'autres animaux aquatiques (Schlenk et Jenkins 2013). Ainsi, l'exposition à certains inhibiteurs de la cholinestérase a été associée à une scoliose chez les poissons (Schultz *et al.* 1985) et les grenouilles (Bacchetta *et al.* 2008).

### Références

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara et G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. *Science of the Total Environment* 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont et R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathrogenic effects of semicarbazide. *Toxicology* 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley et J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. *Journal of the World Aquaculture Society* 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski et D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. *Journal of the World Aquaculture Society* 11: 445-453.

Martinez, I., R. Alvarez, I. Herraes et P. Herraes. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. *Anatomical Records* 233(2): 314-320.

Schlenk, D. et Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. U.S. EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. 21-23 mai 2013. Washington, DC.