



Section 2
Effets sur les systèmes biologiques

Ligne Directrice n° 250

Détection sur des embryons de poisson-
zèbre transgénique tg(cyp19a1b:GFP)
des perturbateurs endocriniens
agissant via les récepteurs des
oestrogènes (essai EASZY)

14 juin 2021

**Lignes directrices de l'OCDE pour
les essais de produits chimiques**



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

Détection sur des embryons de poisson-zèbre transgénique tg(cyp19a1b:GFP) des perturbateurs endocriniens agissant via les récepteurs des œstrogènes (essai EASZY)

INTRODUCTION

1. La méthode d'essai EASZY (*Endocrine Active Substances using Zebrafish embrYos*) est une méthode de dépistage *in vivo* de type mécanistique, conçue pour détecter les perturbateurs endocriniens agissant comme agonistes des récepteurs des œstrogènes (*estrogen receptors*, ER), en induisant l'expression de la protéine fluorescente verte (*Green Fluorescent Protein*, GFP) sous le contrôle du promoteur du gène cyp19a1b. L'essai EASZY permet de détecter l'activité œstrogénique de produits chimiques sur des embryons de poisson-zèbre transgénique tg(cyp19a1b:GFP) exposés pendant 96 heures aux stades du développement embryonnaire. L'Annexe 1 décrit la construction génétique utilisée pour créer la lignée transgénique (1).

2. Le gène cyp19a1b code l'aromatase cérébrale, l'enzyme responsable de la synthèse d'œstrogènes à partir d'androgènes. Chez le poisson, l'expression du gène cyp19a1b est limitée aux cellules gliales radiaires, les cellules progénitrices donnant naissance aux nouveaux neurones depuis les stades embryonnaires jusqu'à l'âge adulte (2)(3). La régulation transcriptionnelle du gène cyp19a1b requiert des récepteurs aux œstrogènes (ER) fonctionnels, et la fixation des ER ligandés sur les éléments de réponse aux œstrogènes (*estrogen response elements*, ERE) et les demi-ERE situés dans la région promotrice du gène cyp19a1b (2). La régulation de cyp19a1b requiert en outre un/des facteur(s) gliaux spécifiques qui se lie(nt) à un élément de réponse au facteur glial x (*glial x-responsive element*, GxRE) agissant en synergie avec les séquences ERE (4). Le GxRE joue un rôle important dans la régulation spécifiquement cellulaire du gène cyp19a1b et sa régulation par les œstrogènes (4).

3. Outre les œstrogènes, des androgènes stéroïdiens peuvent réguler l'activité transcriptionnelle du gène cyp19a1b. Pour les androgènes aromatisables (la testostérone, par exemple), cette régulation implique leur aromatisation en œstrogènes qui vont ensuite se lier aux ER et induire l'expression de cyp19a1b. Alors que la 11-kétotestostérone, un androgène non aromatisable, n'est pas apte à induire l'expression de cyp19a1b, il a été établi que la 5 α -dihydrotestostérone (DHT), un autre androgène non aromatisable, provoque une activité œstrogénique en induisant l'expression de cyp19a1b de façon dépendante des ER. Cela pourrait être dû à sa conversion en β -diol, un stéroïde œstrogénique connu, via l'activité de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (5).

4. Les embryons de poisson-zèbre expriment de l'ARNm des ER β 1 et ER β 2 détectable dans le télencéphale, l'aire préoptique et l'hypothalamus, mais aux stades de développement utilisés dans cet essai, des transcriptions de l'ER α ne sont pas encore détectées dans le cerveau (5)(6). Cela suggère que l'ER β 1 et/ou l'ER β 2 contrôleraient l'expression de l'aromatase B. Chez le poisson-zèbre, l'isoforme ER β 2 présente une plus grande affinité que l'ER α pour les œstrogènes naturels et de synthèse, contrairement à ce qui a été décrit sur l'affinité des sous-types d'ER humains pour ces substances (7).

5. Chez le poisson-zèbre transgénique tg(cyp19a1b:GFP), la GFP mime parfaitement l'expression du cyp19a1b endogène dans le cerveau du poisson-zèbre (1)(8)(9). De ce fait, la mesure

du gène rapporteur GFP chez les embryons tg(cyp19a1b:GFP) permet d'évaluer dans quelle mesure les produits chimiques induisent l'expression du gène cyp19a1b.

6. La méthode EASZY est le fruit de travaux de recherche et d'études de validation au cours desquels cette méthode a été appliquée avec succès à une série de produits chimiques – tels que des hormones naturelles et de synthèse, des produits pharmaceutiques, des pesticides et des produits chimiques industriels – afin d'évaluer leur capacité d'induction de la GFP chez des embryons de poisson-zèbre tg(cyp19a1b:GFP) (10)(11)(12)(13)(14)(15).

7. Dans sa version révisée, le Document-guide n° 150 de l'OCDE sur les essais standardisés pour l'évaluation du pouvoir de perturbation endocrinienne des produits chimiques (16) place EASZY parmi les essais de dépistage de niveau 3 chez le poisson, selon le Cadre conceptuel de l'OCDE pour l'identification des perturbateurs endocriniens, c'est-à-dire parmi les essais *in vivo* fournissant des données sur un ou des mécanisme(s)/voie(s) endocrinien(s). Comme méthode de dépistage de niveau 3, EASZY permet d'identifier les substances d'essai actives/inactives sur la voie de signalisation des ER induisant la GFP, sous le contrôle du promoteur de cyp19a1b régulé par les ER. Les données ne sont pas destinées à être utilisées pour l'évaluation des risques liés aux produits chimiques.

DÉFINITIONS

8. On trouvera à l'Annexe 2 les définitions utilisées dans cette Ligne directrice.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

9. L'Annexe 3 illustre les voies par lesquelles les produits chimiques peuvent provoquer l'activité œstrogénique mesurée, dans l'essai EASZY, d'après l'induction de la GFP, sous le contrôle du promoteur du gène cyp19a1b régulé par les ER chez le poisson-zèbre.

10. EASZY permet de détecter les produits chimiques agissant comme des ligands agonistes des ER et entraînant ainsi l'activation de voies de signalisation des ER au niveau du cerveau. Cette méthode détecte et distingue les produits chimiques exerçant une activité œstrogénique dans des ordres de grandeur allant du ng/L (nM) au mg/L (µM) (10)(11)(13). Cela inclut par exemple des œstrogènes stéroïdiens naturels ou de synthèse, certains bisphénols et des composés alkylphénoliques. La 17β-trenbolone, un stéroïde androgénique, est active, elle aussi, dans l'essai EASZY, qui reflète ses activités agonistes des ER (17)(18).

11. Les embryons de poisson-zèbre ont des capacités de biotransformation leur permettant de catalyser les réactions enzymatiques de phase I et de phase II (19)(20)(21)(22)(23); la méthode EASZY peut donc fournir des informations sur l'activité œstrogénique de produits chimiques pro-œstrogéniques, c'est-à-dire requérant une activation métabolique avant de provoquer une réponse œstrogénique (10)(11). L'analyse comparative des profils métaboliques de certains produits chimiques œstrogéniques chez les embryons de poisson-zèbre et les adultes a confirmé la compétence métabolique de l'embryon de poisson-zèbre (24). Les profils métaboliques similaires trouvés chez les embryons de poisson-zèbre et les adultes montrent que les embryons de poisson-zèbre sont un modèle adapté pour l'évaluation de l'activité œstrogénique des produits chimiques nécessitant une activation métabolique (24). Néanmoins, la prudence s'impose, car l'activité métabolique chez l'embryon n'est pas toujours similaire à celle des sujets jeunes ou des adultes, ce qui peut se traduire par une absence d'activité pour certains produits chimiques pro-œstrogéniques (22).

12. Outre les substances agissant comme ligands agonistes des ER, que ce soit directement ou après métabolisation, il a été observé que certains androgènes stéroïdiens induisaient l'expression du

gène cyp19a1b (voir le paragraphe 3), leur activité dans l'essai EASZY se traduisant par l'induction de la GFP. Les réponses sont strictement médiées par les ER, et ne font pas intervenir de récepteur des androgènes (*androgen receptor*, AR) ou d'élément de réponse aux androgènes (5). Bien que des androgènes stéroïdiens se soient révélés actifs lors des essais, la méthode EASZY n'est pas destinée au dépistage des substances androgènes actives.

13. EASZY peut ne pas détecter des produits chimiques ayant une activité œstrogénique *in vitro* si la plage des concentrations provoquant cette activité est proche de celle qui induit une toxicité chez les embryons de poisson-zèbre.

14. Des résultats négatifs peuvent être obtenus avec certains types de produits chimiques qui, soit sont excrétés rapidement, soit ne passent pas par le chorion. Pour les substances ayant une masse moléculaire $\geq 3\text{kDa}$, une structure moléculaire très encombrante, et les substances provoquant un retard d'éclosion de nature à exclure ou réduire l'exposition post-éclosion, il faut s'attendre à une absence de sensibilité des embryons, du fait de la biodisponibilité limitée de la substance, et d'autres essais pourraient être plus adaptés (25).

15. Avant d'appliquer la méthode d'essai à des mélanges, des produits chimiques difficiles à tester (parce qu'instables, par exemple) ou des produits chimiques à la limite du domaine d'applicabilité décrit dans cette Ligne directrice, il convient d'examiner d'emblée si les résultats obtenus seront scientifiquement significatifs. Des recommandations pour l'essai de ce type de produits (mélanges, UVCB ou substances multiconstituants, notamment) figurent dans le Document-guide n° 23 de l'OCDE (26). Enfin, la méthode n'est pas applicable à l'essai des produits chimiques volatils.

16. Lors de la validation, la méthode d'essai EASZY n'a été évaluée que sur des substances chimiques, et son applicabilité à des mélanges de deux substances ou plus n'a pas été étudiée. Toutefois, l'expérience a montré que la méthode EASZY pourrait permettre d'évaluer des mélanges bi- ou multiconstituants (10)(12)(27)(28).

PRINCIPE DE L'ESSAI

17. Des œufs de poisson-zèbre récemment fécondés (4 heures maximum après la fécondation) sont exposés au produit chimique d'essai pendant 96 heures en conditions semi-statiques, avec un renouvellement complet du milieu d'essai toutes les 24 heures. À la fin de l'expérience, la fluorescence de chaque éléuthéroembryon nouvellement éclos est mesurée au microscope à fluorescence (voir l'Annexe 4 pour le schéma général de l'essai EASZY).

18. La mesure de la GFP est réalisée par imagerie *in vivo*, au microscope à fluorescence, des embryons de poisson-zèbre transgénique tg(cyp19a1b:GFP). Le crâne du poisson-zèbre étant transparent aux premiers stades de son développement, la GFP est observée, imagée et quantifiée *in vivo*. L'intensité de fluorescence est quantifiée au moyen d'un logiciel d'analyse d'image.

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

19. Il importe de disposer des informations suivantes sur les propriétés spécifiques du produit chimique : formule structurale, masse moléculaire, pureté, stabilité à la lumière et dans les conditions de l'essai, constante d'acidité (pKa), coefficient de partage carbone organique/eau (Koc) et coefficient de partage octanol/eau (Koe), solubilité dans l'eau et pression de vapeur, ainsi que résultats d'un essai de biodégradabilité facile selon la LD 301 de l'OCDE (29) ou la LD 310 de l'OCDE (30). La solubilité et la pression de vapeur peuvent être utilisées pour calculer la constante de Henry, qui indiquera si des pertes dues à l'évaporation du produit chimique d'essai peuvent survenir.

20. Il convient de disposer d'une méthode analytique validée, dont l'exactitude, la fidélité et la sensibilité soient connues, pour la quantification du produit chimique d'essai dans la solution d'essai (31), lorsque cela est techniquement réalisable. Les paramètres de performance seront indiqués dans le rapport (exactitude, fidélité, limite de détection, limite de quantification, spécificité, plage de travail, par exemple).

DEMONSTRATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

21. Avant d'appliquer en routine la méthode d'essai EASZY, chaque laboratoire doit faire la preuve de sa compétence technique en utilisant les substances d'épreuve de compétence listées au Tableau 1. Cette liste est composée de substances actives et de substances inactives dans l'essai EASZY. Les substances actives couvrent un registre suffisamment large d'activité œstrogénique, et différentes voies d'induction de la GFP (produits chimiques à ligand agoniste des ER, pro-œstrogéniques, aromatisables et non aromatisables, notamment). Le tableau 1 indique les plages de sensibilité appropriées, déterminées au cours de l'étude de validation (15).

PRODUITS CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

22. Dans les laboratoires où l'essai a été mis en œuvre avec succès, un produit chimique de référence devra être testé régulièrement, afin de vérifier la réactivité des embryons transgéniques. Il convient de procéder à cette vérification une fois par an en réalisant un essai complet avec le 17 α -éthinyloestradiol (EE2) ou le 17 β -œstradiol afin d'établir la CE50 (voir le Tableau 1 pour les concentrations d'essai à appliquer et les plages des valeurs CE50). Il est également recommandé de soumettre à l'essai le produit chimique de référence lorsque des changements significatifs interviennent dans les conditions de reproduction (milieu d'essai, conditions environnementales, nouvelle génération de géniteurs, par exemple).

23. De plus, chaque essai EASZY doit comporter un témoin positif, à savoir EE2 à la concentration finale de 14.8 ng/L (0.05 nM), la concentration la plus basse d'EE2 se traduisant par un facteur multiplicatif maximal de l'induction de GFP. Dans chaque essai EASZY, l'induction de GFP mesurée moyenne induite par le témoin positif doit être ≥ 9 fois celle du témoin solvant.

24. Un facteur multiplicatif de l'induction de GFP par l'EE2 inférieur à 9 invalide l'ensemble des résultats de l'essai. Dans ce cas, on envisagera les actions suivantes : (i) rechercher les problèmes techniques pouvant occasionner une faible induction chez le témoin positif, tels que l'utilisation d'une lampe fluorescente au-delà de sa durée de vie, se traduisant par une baisse d'intensité, (ii) renouveler la solution mère (s'il y a lieu), (iii) vérifier la concentration de la solution mère afin de s'assurer que les conditions étaient appropriées, (iv) réaliser un essai complet permettant l'établissement d'une courbe concentration-réponse avec l'EE2 sur des embryons issus de nouveaux géniteurs. La CE50 doit se situer dans les limites indiquées au Tableau 1.

Tableau 1. Liste des substances d'épreuve de compétence incluant des produits chimiques positifs et négatifs. Les plages de concentrations d'essai et les valeurs de CE50 moyennes, minimales et maximales pour chaque substance d'épreuve sont indiquées en concentrations massiques (mol (M)) et (ng/L ou µg/L).

Substance	Numéro CAS	Mode d'action	Réponse attendue	Plage de concentrations d'essai (M) (ng/L ou µg/L)	CE50 (M) (ng/L ou µg/L)	
					Moyenne	Min - Max
17α-Éthinylœstradiol	57-63-6	Agoniste ER	POS	$6.2 \times 10^{-13} - 1.0 \times 10^{-10}$ (0.18 – 29.6 ng/L)	1.5×10^{-11} (4.4 ng/L)	$8.00 \times 10^{-12} - 2.8 \times 10^{-11}$ (2.4 – 8.3 ng/L)
17β-Œstradiol	50-28-2	Agoniste ER	POS	$1.2 \times 10^{-10} - 1.0 \times 10^{-8}$ (32.7 – 2723 ng/L)	1.48×10^{-9} (404 ng/L)	$5.7 \times 10^{-10} - 2.87 \times 10^{-9}$ (153 – 781 ng/L)
Bisphénol A	80-05-7	Agoniste ER	POS	$1.2 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5}$ (27.3 – 2282 µg/L)	3.75×10^{-6} (856 µg/L)	$2.5 \times 10^{-6} - 5.10 \times 10^{-6}$ (571 – 1141 µg/L)
4-tert-Octylphénol	140-66-9	Agoniste ER	POS	$1.2 \times 10^{-8} - 1.0 \times 10^{-6}$ (2.5 – 206 µg/L)	2.48×10^{-7} (51 µg/L)	$1.80 \times 10^{-7} - 4.40 \times 10^{-7}$ (37 – 85 µg/L)
Noréthindrone	68-22-4	Agoniste ER (pro-œstrogène)	POS	$1 \times 10^{-9} - 1.0 \times 10^{-7}$ (0.3 – 29.8 µg/L)	8.4×10^{-9} (2.5 µg/L)	$4 \times 10^{-9} - 1.40 \times 10^{-8}$ (1.2 – 4.2 µg/L)
Testostérone	58-22-0	Androgène aromatisable	POS	$1.2 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5}$ (34.6 – 2884 µg/L)	7.39×10^{-7} (213 µg/L)	$4.6 \times 10^{-7} - 1.35 \times 10^{-6}$ (118 – 389 µg/L)
11-Kétotestostérone	564-35-2	Androgène non aromatisable	NEG	$1.2 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5}$ (36 – 3024 µg/L)	-	-
Dexaméthasone	50-02-2	Agoniste du récepteur des glucocorticoïdes	NEG	$1.2 \times 10^{-7} - 1.0 \times 10^{-5}$ (47 – 3924 µg/L)	-	-

VALIDITÉ DE L'ESSAI

25. Les critères de validité de l'essai sont les suivants :
- Le taux de fécondation des œufs recueillis dans les différents lots doit être $\geq 70\%$;
 - La mortalité chez les témoins (milieu d'essai et solvant (le cas échéant)) ne doit pas dépasser un embryon par réplicat à la fin de l'essai ;
 - Le taux d'éclosion chez les témoins (milieu d'essai et/ou solvant) doit être $\geq 90\%$ à la fin de l'essai ;
 - Le facteur multiplicatif de l'induction de GFP mesurée moyenne chez le témoin positif (EE2 14.8 ng/L) par rapport au témoin solvant doit être ≥ 9 .

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

26. L'équipement nécessaire est le suivant :
- a) Microscope binoculaire ;
 - b) Microscope à fluorescence équipé d'un objectif 10X, de filtres GFP (filtre d'excitation à 470 nm [Bande Passante 450-490] ; filtre d'émission à 525 nm [BP 500-550]) et d'un appareil photo adapté à l'imagerie de fluorescence ;
 - c) Ordinateur avec logiciel d'analyse d'images ;
 - d) Récipients d'exposition (boîtes de cristallisation, boîtes de Pétri, par exemple) en matériau chimiquement inerte (verre, par exemple), dans lesquels les poissons-zèbres sont exposés. Les récipients d'exposition doivent avoir une capacité adaptée à la charge recommandée (15 à 25 mL de milieu d'essai) ;
 - e) Incubateur à température contrôlée de $27\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$;
 - f) Plaques ou couvercles de verre pour couvrir les récipients d'exposition ;
 - g) Pipette automatique (25 mL) ;
 - h) Pipettes : P10, P200, P1000
 - i) Récipients en verre pour préparer les solutions mères et les différentes concentrations d'essai ;
 - j) Cuves contenant un grand volume de milieu d'essai, destinées à recevoir les poissons transgéniques à maturité sexuelle utilisés comme reproducteurs ;
 - k) Pièges à frai : bacs en verre recouverts d'un grillage (grillage en plastique vert, par exemple) ;
 - l) Pipette Pasteur stérile pour recueillir les œufs dans le bac de reproduction et les transférer dans les récipients d'exposition ;
 - m) Récipients en verre pour recueillir les embryons de poisson-zèbre ;
 - n) Lames d'immunofluorescence multipuits imprimées à revêtement Téflon pour la mesure de la GFP au microscope à fluorescence chez les embryons vivants ;
 - o) Matériel de mesure de la conductivité, du pH, de l'oxygène.

Réactifs

a) Benzocaïne (par exemple solution mère : 100 g/L dans l'éthanol absolu) ou tricaïne (MS-222) (par exemple solution mère : 1.5 g/L dans le milieu d'essai, tamponné au carbonate de calcium pour atteindre un pH de 7.0 – 7.8) comme anesthésique ; l'utilisation d'une autre molécule à cette fin doit être évaluée avec soin au préalable, notamment pour ce qui est de l'absence d'effet sur la GFP.

b) Solution d'eau de Javel concentrée pour euthanasier les embryons de poisson-zèbre (hypochlorite de sodium à 6.15 % ; 1 volume d'eau de Javel pour 5 volumes d'eau).

Préparation de l'essai

Organismes d'essai

27. Le poisson-zèbre transgénique tg(cyp19a1b:GFP) est une lignée homozygote qui exprime la GFP dans toutes les générations, avec un taux stable de transmission du transgène à la progéniture, sans aucune modification, d'une génération à l'autre, de l'expression du transgène et de la réactivité des embryons transgéniques à des produits chimiques agonistes de référence. La lignée transgénique est disponible sur demande auprès du laboratoire chargé de la maintenir¹.

Entretien des animaux

28. Les conditions de culture utilisées pour la lignée transgénique homozygote tg(cyp19a1b:GFP) sont les mêmes que pour le poisson-zèbre de type sauvage (25). Les adultes transgéniques sont croisés entre eux régulièrement afin d'obtenir des embryons homozygotes. Pour assurer la diversité du fond génétique de la souche tg(cyp19a1b:GFP), des mâles ou des femelles transgéniques sont croisés avec des poissons de type sauvage toutes les cinq générations. L'observation de l'expression de la GFP constitutive de la descendance portant le transgène permet de sélectionner les embryons transgéniques qui seront utilisés pour maintenir la souche.

Production et sélection des œufs

29. Pour la production des œufs, des poissons-zèbres transgéniques non exposés sont utilisés comme reproducteurs. Les poissons ne doivent pas présenter de symptômes d'infection ou de maladie discernables à l'examen macroscopique, ni avoir reçu de traitement pharmaceutique (aigu ou prophylactique) dans les deux mois précédant le frai. Les poissons reproducteurs sont maintenus dans des aquariums à 27 °C ± 2 °C, avec une photopériode de 12 à 16 h de lumière par jour et une capacité de charge recommandée de 1 L d'eau par poisson. Les poissons sont maintenus dans de l'eau filtrée sur charbon actif ou toute eau de qualité suffisante pour garantir leur santé et leur reproduction (25).

30. Les œufs de poisson-zèbre transgénique sont produits par frai de masse dans de grandes cuves. Dans la cuve de reproduction, 60 à 100 adultes transgéniques mâles et femelles sont maintenus continuellement ensemble (le rapport mâles/femelles varie de 1:1 à 2:1). Il est également possible de recueillir les œufs de différents frai issus de groupes de poissons adultes appariés, au lieu du frai de masse. Dans ce cas, le taux de fécondation de chaque frai, avant regroupement des différents frai, devra être ≥ 70 %. À défaut, le frai sera écarté de l'essai.

31. Le régime alimentaire suivant est approprié : aliments en flocons déshydratés (maximum 3 % du poids des poissons par jour) 3-5 fois par jour, plus nauplies d'artémies (du genre *Artémia*) et/ou daphnies

¹ Institut national de l'environnement industriel et des risques (INERIS), courriel : groupe-caszy@ineris.fr.

de taille appropriée provenant d'une source non contaminée. Les aliments vivants sont une source d'enrichissement de l'environnement et doivent donc faire partie du régime alimentaire lorsque c'est possible. La veille de l'essai, un bac en verre couvert d'un grillage vert (constitué d'un matériau inerte, et dont les mailles ont une taille empêchant la prédation des œufs par les poissons adultes) est placé dans la cuve de reproduction. Le lendemain matin, le frai est déclenché par l'allumage de la lumière. Le bac en verre contenant les œufs est retiré avec précaution de la cuve de reproduction, entre 90 et 120 minutes après le début de l'éclairage.

32. Les œufs sont transférés du bac en verre à un récipient en verre contenant du milieu d'essai, et l'excès de matières organiques (aliments, fèces) est retiré.

33. Les œufs fécondés présentant un développement normal sont sélectionnés au microscope binoculaire, selon les indications de Kimmel et al., 1995 (32), et transférés dans des récipients en verre dont la charge sera d'un embryon pour 2 mL de liquide.

Enceintes d'essai / Équipement

34. L'incubation se déroule dans des récipients d'exposition constitués d'un matériau chimiquement inerte (verre, par exemple), dont la capacité doit être adaptée à la charge recommandée (15 à 25 mL de milieu d'essai).

Milieu d'essai

35. Un milieu d'essai approprié doit être utilisé, eau reconstituée (ISO 6341 (33), par exemple), ou eau de surface / eau de puits de caractéristiques connues. Le milieu d'essai utilisé est aéré avant l'essai, afin d'assurer une saturation maximale en oxygène, et doit présenter des valeurs acceptables pour le pH (6.5-8.5), la conductivité (300-700 $\mu\text{S}/\text{cm}$) et la température ($27\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$).

Solutions d'essai

36. Les solutions d'essai aux concentrations retenues sont généralement préparées par dilution d'une solution mère. La solution mère sera préparée de préférence en mélangeant le produit chimique d'essai au milieu d'essai par des moyens mécaniques (agitation et/ou ultrasons, par exemple). L'utilisation de solvants ou dispersants organiques peut être nécessaire dans certains cas pour obtenir une solution mère à la concentration voulue, mais on évitera dans toute la mesure du possible le recours à ce type de produits chimiques.

37. S'il faut utiliser un solvant, sa concentration finale dans les solutions d'essai doit être inférieure ou égale à 0.1 mL/L, et devrait être identique dans tous les récipients d'essai, à l'exception du témoin milieu d'essai. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est un exemple de solvant adapté. Les résultats de l'étude de validation ont montré l'absence de différence significative dans l'expression de la GFP entre les témoins négatif et DMSO à 0.1 mL/L.

38. Pour l'essai des produits chimiques classés comme « difficiles à tester », il convient d'utiliser des solvants appropriés, et de suivre les approches décrites dans le Document-guide n° 23 de l'OCDE (26). Le choix du solvant est déterminé par les propriétés chimiques du produit chimique d'essai. Les données devront apporter la preuve que le solvant n'affecte pas l'expression de la GFP.

PROCÉDURE D'ESSAI

39. L'essai EASZY commence avec des embryons fécondés, 4 heures au plus après la fécondation, et se termine au bout de 96 heures d'exposition. On trouvera une description détaillée du stade de

développement normal des embryons de poisson-zèbre à l'Annexe 3 de la Ligne directrice 236 de l'OCDE
Essai de toxicité aiguë chez le poisson au stade embryonnaire (25).

Conditions d'exposition

Charge

40. Sept embryons fécondés sont placés dans un récipient d'exposition contenant 15 à 25 mL de milieu d'essai (concentrations d'essai et témoins). La conception de l'essai doit comporter trois réplicats pour chaque concentration d'essai et témoin. Les embryons fécondés doivent être distribués de façon aléatoire entre les différentes conditions d'essai. Chaque récipient d'exposition est étiqueté de façon claire selon son contenu, et recouvert d'un couvercle en verre destiné à éviter l'évaporation du milieu d'essai et à réduire le risque de contamination croisée.

Conditions d'essai

41. Les récipients d'exposition sont incubés dans une enceinte climatique humidifiée, à une température de $27\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, sous photopériode contrôlée (12 à 16 heures de lumière : 12 à 8 heures d'obscurité). Au début de l'essai, et à chaque renouvellement, la concentration d'oxygène dissous doit être $\geq 80\%$ de la valeur de saturation.

42. Les solutions d'essai et les solutions témoins sont entièrement renouvelées toutes les 24 heures pendant la période d'exposition.

Alimentation

43. Aucune alimentation n'est nécessaire pendant la durée de l'essai.

Concentrations d'essai

44. La concentration d'essai maximale sera établie selon la plus basse des trois valeurs suivantes : limite de solubilité du produit chimique d'essai dans le milieu d'essai, concentration maximale tolérée (CMT) ou concentration maximale de 100 mg/L. La CMT est définie comme la concentration d'essai du produit chimique la plus élevée pour laquelle la mortalité ne dépasse pas un embryon par réplicat à la fin de l'essai.

45. Si des données sont d'ores et déjà disponibles sur la toxicité (données de toxicité aiguë pour d'autres espèces aquatiques, incluant des embryons de poissons, données QSAR ou possibilités de références croisées, par exemple), on pourra recourir à un jugement d'expert pour déterminer la concentration maximale d'essai.

46. Si l'on ne dispose pas de données pertinentes sur la toxicité aiguë du produit chimique, il conviendra de procéder à une étude de détermination de l'ordre de grandeur, c'est-à-dire de la plage de travail, sur des embryons de poisson-zèbre tg(cyp19a1b:GFP), afin d'évaluer la toxicité potentielle du produit. Cet essai portera sur un minimum de trois concentrations d'essai formant une suite géométrique, séparées par un facteur ne dépassant pas 10. Un seul réplicat de 10 embryons sera préparé par condition d'essai (concentrations d'essai et témoin). Pour l'étude de détermination de l'ordre de grandeur, chaque récipient d'exposition contiendra 25 mL de milieu d'essai.

47. Un minimum de trois concentrations d'essai sera utilisé dans l'étude principale, séparées par un facteur compris de préférence entre 3 et 10. Il est possible d'utiliser un plus grand nombre de

concentrations pour établir une relation concentration-réponse complète, utilisable pour déterminer les concentrations efficaces (CE_x).

48. La concentration la plus élevée devrait se traduire par un effet maximal du produit chimique d'essai sur l'expression de la GFP, et la concentration la plus basse devrait n'avoir aucun effet significatif sur la fluorescence par rapport au témoin. L'effet maximal du produit chimique d'essai sur l'expression de la GFP peut être comparable à celui du témoin positif, ou plus faible que ce dernier. Les concentrations du produit chimique d'essai ne devront pas induire une mortalité supérieure à un embryon par réplicat. Si ces critères ne sont pas remplis, les données de la/des concentration(s) d'essai ne sont pas prises en compte pour l'étude de la relation concentration-réponse.

Témoins

49. Les témoins suivants sont nécessaires :

- Témoin négatif : des embryons de poisson-zèbre sont exposés au milieu d'essai ;
- Témoin positif : des embryons de poisson-zèbre sont exposés à l'EE2 à une concentration finale de 14.8 ng/L (0.05 nM), c'est-à-dire à la concentration la plus basse d'EE2 se traduisant par un facteur multiplicatif maximal de l'induction de GFP. Cette solution d'essai est préparée à partir d'une solution mère d'EE2 concentrée 10³ X, solubilisée dans le DMSO et stockée à -20 °C dans l'obscurité. Pour assurer la reproductibilité des résultats entre les essais, il convient de ne pas conserver la solution mère d'EE2 plus d'un mois ;
- Témoin solvant (s'il y a lieu) : lorsqu'un témoin solvant est requis, le niveau maximal de solvant ne doit pas dépasser 0.1 mL/L ou 100 mg/L (27) et l'effet du solvant doit être vérifié avant la conduite de l'essai, afin de s'assurer qu'il n'induit pas une expression significative de la GFP. Il ne devrait pas être observé de différence statistiquement significative entre le témoin solvant et le témoin négatif pour ce qui est de l'expression de la GFP. Si une différence statistiquement significative est détectée, l'essai devra être répété. Le témoin négatif peut éventuellement être omis et le test effectué avec le témoin solvant uniquement, à la condition que ces dispositions satisfassent aux exigences du cadre réglementaire le cas échéant.

Dosages analytiques

50. La méthode d'exposition utilisée comportant un renouvellement semi-statique, il convient de documenter la stabilité de la concentration du produit chimique d'essai. Les concentrations de produit chimique d'essai devront être mesurées au minimum pour la concentration la plus élevée et la plus basse, mais de préférence pour toutes les concentrations d'essai. Les concentrations de produit chimique d'essai seront mesurées dans les solutions d'essai fraîchement préparées (T₀) et immédiatement avant le renouvellement de la solution d'essai dans l'un des trois réplicats (T₂₄ ± 2 heures), au moins une fois pendant la période d'exposition. La stabilité du produit chimique d'essai devrait être telle que la concentration d'exposition demeure dans les limites de ± 20 % par rapport à la concentration nominale sur une durée de 24 h. On pourra envisager de pré-conditionner les récipients d'essai avec les solutions d'essai pendant au moins 24 h avant le début de l'essai, afin de limiter à un minimum les pertes de produit chimique d'essai par adsorption. Si la concentration ne peut pas être maintenue dans les limites de ± 20 % par rapport aux concentrations nominales, les résultats seront exprimés en fonction de la moyenne géométrique des concentrations mesurées.

Observations et renouvellement des solutions d'essai/témoins

51. Les solutions d'essai (groupes témoins et groupes traités) sont renouvelées chaque jour. Pour chaque condition d'essai, de la solution fraîchement préparée est ajoutée dans le récipient d'exposition

immédiatement après le retrait de la solution d'essai usagée. Lors du renouvellement, on veillera à éviter le dessèchement des embryons. Le pH, la concentration d'oxygène dissous, la conductivité et la température sont mesurés avant le renouvellement et dans les solutions d'essai et témoins fraîchement préparées.

52. Pendant la période d'exposition, la mortalité des embryons est contrôlée chaque jour et les embryons morts sont retirés. À la fin de l'exposition, le taux de mortalité cumulé est calculé et consigné pour les groupes témoins et les groupes traités (voir le paragraphe 66). L'éclosion est enregistrée quotidiennement dans les groupes traités et témoins à partir de 48 heures. Les observations sont consignées toutes les 24 heures, jusqu'à la fin de l'essai. Ces observations, réalisées selon les indications de la LD 236 de l'OCDE (26), peuvent constituer une aide pour l'interprétation des données. Un retard dans les taux d'éclosion, en particulier, peut réduire l'exposition des poissons au produit chimique d'essai, ce qui limite la capacité de l'essai EASZY à détecter un effet.

53. Toutes autres observations pertinentes sur le développement des poissons, telles qu'un œdème ou des malformations caudales, seront consignées sur une base quantitative.

Mesures de fluorescence

54. À la fin de l'exposition, les embryons de poisson-zèbre éclos sont transférés avec précaution (un animal par puits) de chacun des récipients d'exposition à une lame d'immunofluorescence multipuits en verre hydrophobe, au moyen d'une pipette Pasteur. Une lame d'immunofluorescence 24 puits permet le transfert de tous les embryons d'un même groupe d'exposition. Cette opération peut être réalisée avec ou sans anesthésie des embryons.

55. Si l'anesthésie des poissons-zèbres est retenue, elle est pratiquée directement dans les enceintes d'essai, la benzocaïne est utilisée à une concentration finale de 50 mg/L, la tricaine à une concentration finale de 150 mg/L. Après 5 minutes d'exposition à l'anesthésique, les embryons éclos sont transférés sur la lame d'observation. Cette anesthésie douce n'est pas létale pour cette durée d'exposition, et les embryons récupèrent rapidement. Chaque puits de la lame d'immunofluorescence contenant des embryons de poisson-zèbre vivants est observé.

56. Chaque poisson-zèbre est ensuite photographié dorsalement. Il est impératif que les poissons soient positionnés correctement pour que l'expression de la GFP puisse être comparée d'un poisson à un autre (voir les Annexes 5 et 6). Un positionnement inapproprié des poissons se traduira par une mesure incorrecte de la fluorescence. C'est pourquoi, en cas de position inappropriée (vue ventrale ou latérale), l'opérateur devra réorienter l'embryon avec la pointe d'une pipette, afin de pouvoir l'observer dorsalement. Du milieu de montage (méthylcellulose, par exemple) pourra être utilisé lors de cette opération. À ce stade de développement, les embryons de poisson-zèbre présentent une pigmentation variable d'un individu à l'autre. Néanmoins, cela n'empêche pas la mesure de la GFP, et n'affecte pas le résultat de l'essai. En cas de malformation grave (œdème péri-vitellin et/ou péricardique sévère, malformations sévères de la tête, par exemple), il peut être difficile d'orienter l'embryon comme il convient, ce qui peut compromettre une mesure correcte de la fluorescence. Une fois les embryons orientés correctement, la tête de chacun est photographiée. Les paramètres du microscope pour la mesure en fluorescence seront déterminés avant tout essai de produit chimique, et devront rester identiques d'un essai à l'autre, afin que les données soient comparables.

57. Le réglage des paramètres de fluorescence et la quantification de la GFP par analyse d'image sont réalisés selon les indications des Annexes 7 et 8 respectivement.

58. À la fin de l'essai, les embryons de poisson-zèbre sont euthanasiés selon un protocole combinant l'anesthésie à la benzocaïne à un choc hypothermique induisant la mort (34), ou à l'addition d'une solution d'eau de Javel (hypochlorite de sodium à 6.15 % ; 1 volume d'eau de Javel pour 5 volumes d'eau).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Analyse des données / évaluation des résultats d'essai

59. Après analyse de l'image de chaque embryon, les résultats sont enregistrés dans une feuille de calcul. Pour chaque condition d'exposition, on quantifie la fluorescence chez les individus, mesurée sous la forme de densité intégrée chez le poisson-zèbre transgénique *cyp19a1b-GFP* (voir l'Annexe 8), en l'exprimant en termes de facteur multiplicatif de l'induction par rapport au témoin milieu d'essai ou au témoin solvant, si un témoin solvant est utilisé. L'Annexe 9 donne un exemple de relevé et d'analyse des données.

60. Afin d'identifier l'activité potentielle d'un produit chimique, on compare les réponses entre groupes traités et groupes témoins par analyse de la variance (ANOVA) des moyennes de chaque réplicat. Un test statistique approprié doit être réalisé entre les témoins milieu d'essai et solvant pour la GFP. On trouvera des précisions sur le traitement des données relatives aux témoins milieu d'essai et solvant lors de l'analyse statistique subséquente dans le document de l'OCDE relatif aux méthodes actuelles d'analyse statistique des données d'écotoxicité (35). Si les conditions nécessaires pour les méthodes paramétriques ne sont pas réunies – distribution non normale (test de Shapiro-Wilk, par exemple) ou variance hétérogène (test de Bartlett ou Levene) –, il convient d'envisager une transformation des données afin d'homogénéiser les variances, avant la conduite de l'ANOVA. La transformation logarithmique des facteurs multiplicatifs de l'induction est la première transformation à envisager. Le choix d'un test post-hoc après l'ANOVA dépend de la monotonie de la relation concentration-réponse. Le test de Dunnett (paramétrique) pour les comparaisons multiples appariées, ou encore soit un test de Dunn soit un test de Mann-Whitney avec ajustement Holm-Bonferroni (non paramétrique), peut être utilisé pour les relations concentration-réponse non monotones. D'autres tests statistiques sont applicables (test de Jonckheere-Terpstra ou test de Williams, par exemple) si la relation concentration-réponse est approximativement monotone. Un logigramme décisionnel figure à l'Annexe 10. Pour plus d'informations, on pourra également consulter le document de l'OCDE relatif aux méthodes actuelles d'analyse statistique des données d'écotoxicité (35).

61. Outre la présence d'un effet statistiquement significatif, l'ampleur des effets sera prise en compte pour identifier si un produit chimique d'essai est inactif (produit exempt d'activité œstrogénique) ou actif (produit présentant une activité œstrogénique). Cette combinaison aidera à éviter d'éventuels faux positifs dans l'essai EASZY. Le seuil d'induction a été établi à un facteur multiplicatif au moins égal à 2, sur la base des études de validation, au cours desquelles certains produits chimiques d'essai inactifs ont pu occasionnellement induire des effets significatifs, mais avec un facteur multiplicatif de l'induction inférieur ou égal à 2.

62. On trouvera à l'Annexe 11 des exemples de courbes concentration-réponse combinant l'analyse statistique et le seuil d'induction de 2, ainsi que leur interprétation pour ce qui est de l'activité du produit chimique dans l'essai EASZY.

63. Si un produit chimique d'essai provoque une induction statistiquement significative par rapport au témoin avec une induction de GFP moyenne inférieure à 2, ce produit chimique ne peut pas être considéré comme actif dans EASZY (voir l'Annexe 11, exemple (i)). Dans ce cas, il est vivement recommandé de répéter l'épreuve. Si, lors de la nouvelle épreuve, le produit chimique d'essai induit toujours une réponse significative avec une induction moyenne inférieure ou égale à 2, ce produit ne peut pas être classé comme actif. Si, à l'inverse, un produit chimique d'essai donne une induction non significative avec un facteur multiplicatif supérieur à 2 pour l'induction de GFP moyenne, l'épreuve doit être répétée (voir l'Annexe 11, exemple (j)). Si des données similaires sont obtenues, il n'est pas possible de tirer des conclusions sur la seule base des résultats de l'essai EASZY.

64. Pour les produits chimiques actifs dans l'essai EASZY, il est possible de déterminer la concentration la plus basse de produit chimique d'essai induisant un effet significatif, ainsi que la concentration se traduisant par un niveau maximal d'induction de la GFP (voir l'Annexe 9).

65. Les deux phases de l'étude de validation ont apporté la preuve de la fiabilité, de l'exactitude et de la robustesse de l'essai EASZY. Il a été démontré qu'une conclusion sur l'activité œstrogénique d'un produit chimique d'essai peut être tirée d'une seule épreuve, à condition que les critères de validité (voir le paragraphe 25) et les critères de décision soient remplis (voir le paragraphe 61).

Rapport d'essai

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

Produit chimique d'essai :

- apparence physique, hydrosolubilité et autres propriétés physicochimiques pertinentes ;
- identification chimique : numéro CAS ou nom CAS, nom IUPAC, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté et identification chimique des impuretés s'il y a lieu.

Organismes d'essai :

- nom scientifique, souche, origine et méthode de production et de collecte des œufs, et manipulations ultérieures des œufs fécondés.

Conditions de l'essai :

- conception de l'essai : types de témoins, nombre de concentrations, types de récipients d'essai ;
- photopériode, intensité lumineuse ;
- caractéristiques de l'eau utilisée pour l'entretien des poissons (pH, température, conductivité, oxygène dissous, etc.) ;
- concentration d'oxygène dissous, pH, température et conductivité des solutions d'essai au début de l'essai et avant le renouvellement du milieu d'essai ;
- méthode de préparation des solutions mères et des solutions d'essai, et fréquence de renouvellement ;
- justification de l'emploi d'un solvant et justification de son choix, s'il y a lieu ;
- présence visible de produit chimique d'essai non dissous, s'il y a lieu ;
- concentrations d'essai nominales et résultats de toutes les analyses de détermination de la concentration de produit chimique d'essai dans les récipients d'essai ; on indiquera également le rendement de récupération et la limite de détection de la méthode.

Résultats :

- taux de fécondation des œufs ;
- taux de mortalité dans les groupes témoins et les groupes traités (pour chaque réplicat, et valeur moyenne) ;
- taux d'éclosion dans les groupes témoins et les groupes traités (pour chaque réplicat, et valeur moyenne) ;
- expression moyenne de la GFP mesurée chez le témoin positif ;

- expression individuelle de la GFP dans tous les groupes traités et témoins ;
- analyse statistique et traitement des données GFP ;
- concentration d'essai maximale sans effet sur la GFP au cours de l'essai ;
- concentration la plus basse pour laquelle un effet statistiquement significatif a été établi ;
- concentration de produit chimique d'essai et facteur multiplicatif de l'induction pour lesquels une réponse maximale a été observée ;
- représentation graphique de la courbe concentration-réponse pour l'expression de la GFP ;
- incidence et description des anomalies morphologiques et physiologiques, s'il y a lieu ;
- incidents survenus au cours de l'essai qui ont pu influencer sur les résultats.

67. Tout écart par rapport à la Ligne directrice sera mentionné et expliqué. Les résultats seront interprétés sous l'angle de l'activité œstrogénique potentielle du produit chimique d'essai, à la lumière des critères de validité et de décision. Les résultats seront discutés. Si le nombre de concentrations d'essai a permis d'établir une courbe concentration-réponse complète, la concentration efficace induisant 50 % de l'effet maximal du produit chimique d'essai (CE50) peut être calculée avec un intervalle de confiance à 95 %, et indiquée dans la partie discussion. Les résultats de l'étude d'interétalonnage ont montré qu'EASZY permet une quantification fiable de la CE50 des produits chimiques œstrogéniques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Tong, SK, Mouriec, K, Kuo, MW, Pellegrini, E., Gueguen, MM., Brion, F., Kah, O., Chung, BC (2009). A *cyp19a1b*-GFP (Aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis* 47(2):67-73 doi:[10.1002/dvg.20459](https://doi.org/10.1002/dvg.20459).
2. Menuet A, Pellegrini E, Brion F, Gueguen M-M, Anglade I, Pakdel F, Kah O (2005) Expression and estrogen-dependant regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J. Comp. Neurol.*, 485: 304-320.
3. Pellegrini E, Mouriec K, Anglade I, Menuet A, Le Page Y, Gueguen MM, Marmignon MH, Brion F, Pakdel F, Kah O (2009) Identification of aromatase-positive radial cells as progenitor cells in the ventricular layer of forebrain in zebrafish. *J. Comp. Neurol.*, 2007, 501(1):150-167.
4. Le Page Y, Menuet A, Kah O, Pakdel F (2008). Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1549–1557.
5. Mouriec K, Gueguen MM, Manuel C, Percevault F, Thiulant ML, Pakdel F, Kah O (2009) Androgens upregulate *cyp19a1b* (aromatase B) gene expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors. *Biol Reprod.* 80(5):889-96. doi: [10.1095/biolreprod.108.073643](https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073643).
6. Griffin LB, January KE, Ho KW, Cotter KA, Callard GV (2013). Morpholino-mediated knockdown of ER α , ER β a, and ER β b mRNAs in zebrafish (*Danio rerio*) embryos reveals differential regulation of estrogen-inducible genes. *Endocrinology.* 154(11):4158-69. doi: [10.1210/en.2013-1446](https://doi.org/10.1210/en.2013-1446).
7. Cosnefroy A, Brion F, Maillot-Marechal E, Porcher JM, Pakdel F, Balaguer P, Ait-Aissa S (2012). Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using

- stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicological Sciences* 125(2): 439-449 <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr297>.
8. Vosges M, Le Page Y, Chung BC, Combarous Y, Porcher JM, Kah O, Brion F (2010) 17 α -Ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Aquat. Toxicol.*, 99(4), 479-491.
 9. Vosges M, Kah O, Hinfray N, Chadili E, Le Page Y, Combarous Y, Porcher JM, Brion F (2012) 17 alpha-ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. *Reprod. Toxicol.*, 33 (2): 198-204.
 10. Brion F, Le Page Y, Piccini B, Cardoso O, Tong SK, Chung BC, Kah O. (2012) Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. *PLoS ONE.*;7(5):e36069. doi: 10.1371/journal.pone.0036069.
 11. Cano-Nicolau J, Garoche C, Hinfray N, Pellegrini E, Boujrad N, Pakdel F, Kah O, Brion F (2016) Several synthetic progestins disrupt the glial cell specific-brain aromatase expression in developing zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol.*;305:12-21. doi: 10.1016/j.taap.2016.05.019. Le Page Y, Menuet A, Kah O, Pakdel F (2008). Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1549–1557.
 12. Hinfray N, Tebby C, Garoche C, Piccini B, Bourguine G, Aït-Aïssa S, Kah O, Pakdel F, Brion F (2016) Additive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on brain aromatase (cyp19a1b) in zebrafish specific in vitro and in vivo bioassays. *Toxicol Appl Pharmacol.*307:108-114. doi: 10.1016/j.taap.2016.07.023.
 13. Le Fol V, Aït-Aïssa S, Sonavane M, Porcher JM, Balaguer P, Cravedi JP, Zalko D, Brion F. (2017) In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicol Environ Saf.*;142:150-156. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.04.009.
 14. Neale PA, Altenburger R, Aït-Aïssa S, Brion F, Busch W, de Aragão Umbuzeiro G, Denison MS, Du Pasquier D, Hilscherová K, Hollert H, Morales DA, Novák J, Schlichting R, Seiler TB, Serra H, Shao Y, Tindall AJ, Tollefsen KE, Williams TD, Escher BI (2017) Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water. *Water Res.*;123:734-750. doi: 10.1016/j.watres.2017.07.016.
 15. OECD (2021), Validation report for the detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic *tg(cyp19a1b:GFP)* Zebrafish embryos (EASZY assay), OECD Series on Testing and Assessment, No. 335, OECD Publishing, Paris.
 16. OECD (2018), *Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*, OECD Series on Testing and Assessment, n° 150, OECD Publishing , Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>.
 17. Browne P, Judson RS, Casey WM, Kleinstreuer NC, and Thomas RS (2015). Screening Chemicals for Estrogen Receptor Bioactivity Using a Computational Model *Environmental Science & Technology* 49 (14), 8804-8814 DOI: 10.1021/acs.est.5b0264.
 18. OECD (2016), *Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264265295-en>.

19. Goldstone JV, McArthur AG, Kubota A, Zanette J, Parente T, Jönsson ME, Nelson DR, Stegeman JJ (2010) Identification and developmental expression of the full complement of Cytochrome P450 genes in Zebrafish. *BMC Genomics*.11:643. doi: 10.1186/1471-2164-11-643.
20. Brox, S, Seiwert, B, Haase, N, Kuster, E, Reemtsma, T. (2016) Metabolism of clofibrac acid in zebrafish embryos (*Danio rerio*) as determined by liquid chromatography-high resolution-mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 185–186, 20–28.
21. Brox, S, Seiwert, B, Kuster, E, Reemtsma, T. (2016) Toxicokinetics of polar chemicals in zebrafish embryo (*Danio rerio*): Influence of physicochemical properties and of biological processes. *Environ. Sci. Technol.*,10264–10272.
22. Saad M, Cavanaugh K, Verbueken E, Pype C, Casteleyn C, van Ginneken C, van Cruchten S (2016) Xenobiotic metabolism in the zebrafish: A review of the spatiotemporal distribution, modulation and activity of cytochrome P450 families 1 to 3. *J. Toxicol. Sci.*, 41, 1–11.
23. Otte JC, Schultz B, Fruth D, Fabian E, van Ravenzwaay B, Hidding B, Salinas ER (2017) Intrinsic Xenobiotic Metabolizing Enzyme Activities in Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*), *Toxicol. Sci.*, 159(1): 86–93.
24. Le Fol V, Brion F, Hillenweck A, Perdu E, Bruel S, Aït-Aïssa S, Cravedi JP, Zalko D (2017) Comparison of the *in vivo* biotransformation of two emerging estrogenic contaminants, BP2 and BPS, in zebrafish embryos and adults. *Int J Mol Sci.* 25;18(4). pii: E704. doi: 10.3390/ijms18040704.
25. OECD (2013), *Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>.
26. OECD (2018), *Guidance Document on Aqueous-Phase Aquatic Toxicity Testing of Difficult Test Chemicals*, OECD Series on Testing and Assessment, N°. 23, (Second Edition), OECD Publishing, Paris.
27. Petersen K, Fetter E, Kah O, Brion F, Scholz S, Tollefsen KE (2013) Transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos as a tool for assessing combined effects of oestrogenic chemicals. *Aquat Toxicol.* 138-139:88-97. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.05.001.
28. Hinfray N, Tebby C, Piccini B, Bourguine G, Aït-Aïssa S, Porcher JM, Pakdel F, Brion F. (2018) Mixture concentration-response modeling reveals antagonistic effects of estradiol and genistein in combination on brain aromatase gene (cyp19a1b) in zebrafish. *Int J Mol Sci.* 19(4). pii: E1047. doi: 10.3390/ijms19041047.
29. OECD (1992), *Test No. 301: Ready Biodegradability*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070349-en>.
30. OECD (2014), *Test No. 310: Ready Biodegradability - CO₂ in sealed vessels (Headspace Test)*, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264224506-en>.
31. OECD (2014) *Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Methods – Guidance used in Support of Pre and Post-Registration Data Requirements for Plant Protection and Biocidal Products*, OECD Series on Testing and Assessment, N° 204, OECD Publishing Paris.

32. Kimmel CB, Ballard W, Kimmel SR, Ullman B, Schilling T (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253-310 <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>.
33. ISO (2012) ISO 6341: Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test
34. Matthews M, Varga ZM. (2012) Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR J.*;53(2):192-204. doi: 10.1093/ilar.53.2.192.
35. OECD (2006) *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Series on Testing and Assessment No. 54*, OECD Publishing Paris.
36. OECD (2005) *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated test Methods for hazard Assessment, Series on Testing and Assessment No. 34*, OECD Publishing Paris.

ANNEXE 1 Construction génétique utilisée pour créer les fondateurs de la lignée *tg(cyp19a1b:GFP)*.

La lignée de poisson-zèbre transgénique *tg(cyp19a1b:GFP)* a été développée et caractérisée par Tong et al., 2009 (1). Dans ce modèle, l'expression de la protéine fluorescente verte (*Green Fluorescent Protein*, GFP) est contrôlée par 3.4 kb du promoteur proximal du gène *cyp19a1b* du poisson-zèbre, suivi du premier exon, du premier intron et du début du second exon comprenant le site naturel initiateur de la traduction (voir le Graphique 1 pour la construction génétique).



Graphique 1 : schéma illustrant la construction *cyp19a1b-GFP* utilisée pour créer les fondateurs transgéniques. Elle comprend 3 424 pb de la région flanquante 5', 54 pb de l'exon I (non traduit), 1 698 pb de l'intron I et 20 pb de l'exon II non traduit, suivi du site naturel initiateur de la traduction. Le gène GFP avec la séquence SV40 polyA (poly A) a été fusionné aux 10 premiers acides aminés de CYP19A1B avec un « linker » 9-aa. GxRE : élément de réponse au facteur glial x (*glial x-responsive element*), ATG : site initiateur de la traduction (extrait de Tong et al., 2009) (1).

ANNEXE 2 Définitions et abréviations

aa : acide aminé

Activité anti-œstrogénique : capacité d'un produit chimique à supprimer l'action du 17 β -œstradiol médiée par les récepteurs des œstrogènes.

Activité œstrogénique : capacité d'une substance d'essai à mimer l'action du 17 β -œstradiol et son aptitude à activer, d'une façon spécifique des ER, le cyp19a1b endogène et/ou la GFP sous le contrôle du promoteur du cyp19a1b.

Agoniste : produit chimique/ligand qui se lie à un récepteur nucléaire spécifique et l'active, induisant l'activité transcriptionnelle du/des gène(s) régulé(s) par le récepteur nucléaire.

Antagoniste : produit chimique/ligand qui se lie à un récepteur et bloque ou inhibe la réponse médiée par un ligand agoniste.

Aromatase cérébrale : enzyme codée par le gène cyp19a1b. Elle est responsable de la synthèse endogène des œstrogènes.

Cyp19a1b : nom du gène codant la forme cérébrale de l'aromatase.

Densité intégrée : somme de toutes les intensités associées aux pixels dans la région d'intérêt (*Region Of Interest*, ROI).

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

E2 : 17 β -œstradiol.

EE2 : 17 α -éthinyloœstradiol.

ER (*Estrogen Receptor*) : récepteur des œstrogènes.

ERE (*Estrogen Response Element*) : élément de réponse aux œstrogènes.

Facteur multiplicatif de l'induction de GFP : forme sous laquelle est exprimée la fluorescence de chaque embryon.

Fiabilité : indique dans quelle mesure une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée par calcul de la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoires.

GFP (*Green Fluorescent Protein*) : protéine fluorescente verte.

Haf : heures après fécondation.

Jaf : jours après fécondation.

Pb : paire de bases.

Pertinence : description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle indique à quel point l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de l'exactitude d'une méthode d'essai.

Produit chimique d'essai actif : tout produit chimique d'essai induisant une expression significative de la GFP, avec un facteur multiplicatif de l'induction de GFP mesurée moyenne > 2 par rapport au témoin.

Produit chimique d'essai inactif : toute substance pour laquelle aucun effet significatif sur l'expression de la GFP n'est mesuré par rapport au témoin, l'expression de la GFP mesurée moyenne étant ≤ 2 .

ROI (*Region Of Interest*) : région d'intérêt.

Sensibilité : proportion de tous les produits chimiques positifs/actifs qui sont classés correctement par l'essai. Il s'agit d'une mesure de l'exactitude d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important dans l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (36).

Spécificité : proportion de tous les produits chimiques négatifs/inactifs qui sont classés correctement par l'essai. Il s'agit d'une mesure de l'exactitude d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important dans l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (36).

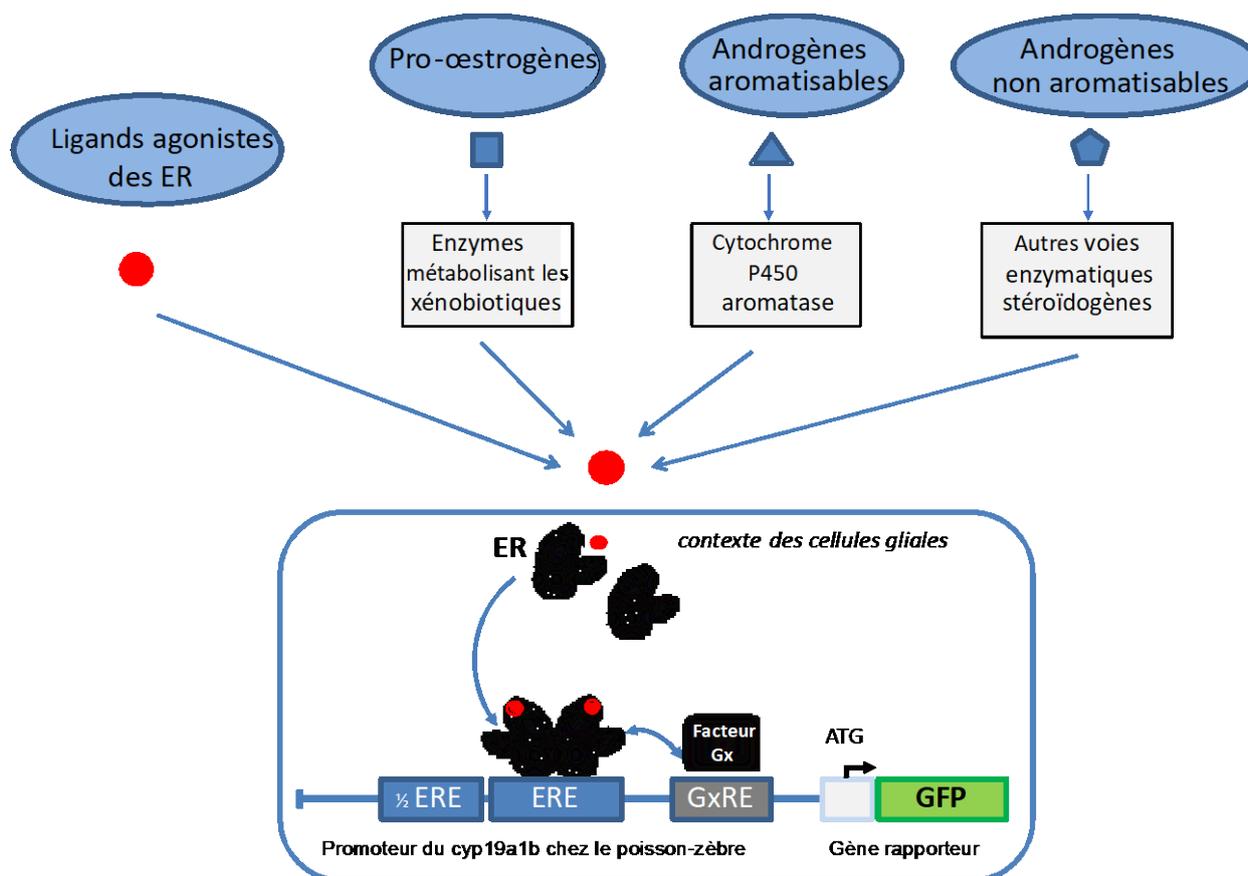
Substances d'épreuve de compétence : sous-ensemble des produits chimiques de référence qui peut être utilisé par les laboratoires afin de démontrer leur compétence technique pour un essai standardisé.

tg(*cyp19a1b*:GFP) : désigne le poisson-zèbre transgénique exprimant de façon stable un gène rapporteur (la protéine fluorescente verte, GFP) sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* du poisson-zèbre.

UVCB (*Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials*) : substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques.

ANNEXE 3 Voies par lesquelles des produits chimiques peuvent provoquer une activité œstrogénique, mesurée d'après l'induction de la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* chez le poisson-zèbre

La figure 3 illustre la voie par laquelle les produits chimiques engendrent une activité œstrogénique mesurée par l'induction de la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* chez le poisson-zèbre.



Graphique 1 : Le schéma illustre par quelles voies les produits chimiques d'essai provoquent une activité œstrogénique, révélée par leur capacité à induire l'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* régulé par les ER chez le poisson-zèbre. Cela passe notamment par la liaison directe des produits chimiques aux ER comme agonistes, ou leur liaison aux ER après métabolisation (pro-œstrogènes). Il est apparu que certains androgènes aromatisables sont actifs dans l'essai EASZY via leur aromatisation en œstrogènes, de même que la dihydrotestostérone (DHT), un androgène non aromatisable, ce qui reflète probablement sa conversion, par d'autres voies stéroïdogènes, en 5alpha-androstane-3bêta,17bêta-diol (β -diol), un métabolite de la DHT connu pour son activité œstrogénique.

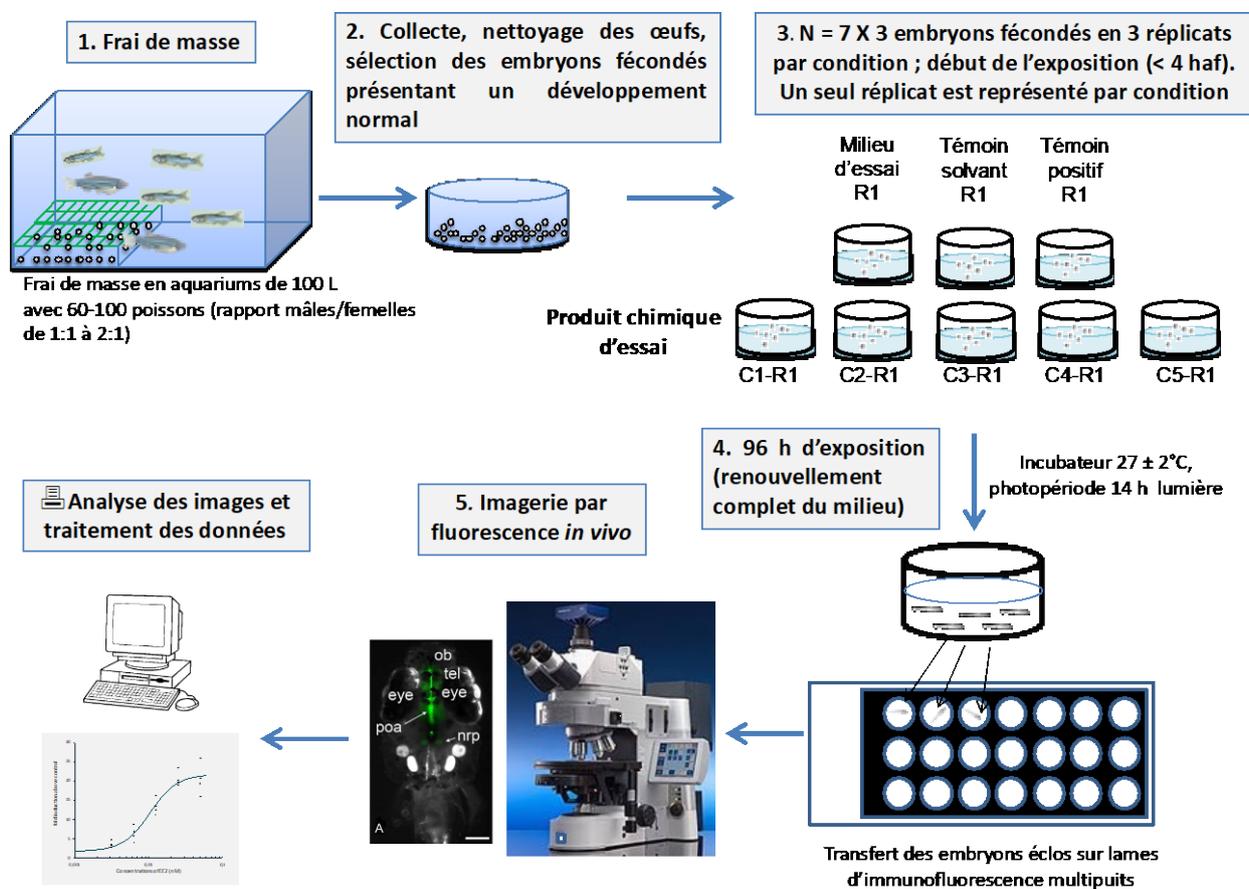
Un panel d'hormones synthétiques et naturelles, ainsi que des produits chimiques appartenant à diverses classes ont été testés pour leur capacité à induire la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* chez le poisson-zèbre (Brion et al., 2012, Cano-Nicolau et al., 2016, Le Fol et al., 2017a, Neale et al., 2017, Serra et al., 2018).

Sur la base de ces études et des études inter-laboratoires réalisées pour la validation de l'essai EASZY (15), il peut être conclu que la GFP est induite d'une façon spécifique via le récepteur à œstrogène par les produits chimiques qui se lient directement au récepteur en tant qu'agonistes. L'essai détecte et distingue les agonistes du récepteur à œstrogène dès les faibles concentrations en ng/L (p. ex. les œstrogènes stéroïdiens naturels ou synthétiques) jusqu'aux concentrations plus élevées de l'ordre de quelques mg/L (p.ex. les bisphénols). Parmi ces produits chimiques, il est à noter que certains sont des androgènes non-aromatisables tels que la 17 β -trenbolone sont également actifs. Concernant la 17 β -trenbolone, son activité œstrogénique reflète probablement sa capacité à se lier et activer le récepteur à œstrogène à de fortes concentrations. Effectivement, dans plusieurs modèles *in silico* et *in vitro* de transactivation du récepteur à œstrogène, la 17 β -trenbolone est identifiée comme une substance positive (Browne et al., 2015, OECD TG 455). De plus, chez le rat, il a été mis en évidence que la 17 β -trenbolone agit au niveau du cerveau pour altérer l'expression de protéines via les récepteurs à androgène et les récepteurs à œstrogène (Fucui Ma & Daicheng Liu, 2015). Ces données *in vitro* et *in vivo* montrent que la 17 β -trenbolone se lie au récepteur à œstrogène en tant qu'agoniste pour induire une réponse *in vitro* et *in vivo* sur des modèles de vertébrés variés, comprenant les embryons de poisson zèbre.

Dans l'essai EASZY, les substances qui nécessitent une biotransformation avant de devenir actives sont également détectées. Plusieurs substances qui requièrent une activation métabolique pour devenir des métabolites œstrogéniques actifs ont montré l'induction de la GFP en lien avec le récepteur à œstrogène. Par exemple le méthoxychlor dont le métabolite 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroéthane HPTC engendre une activité de type œstrogénique. Par ailleurs, plusieurs progestines synthétiques 19-nortestostérone ont induit la GFP en lien avec le récepteur à œstrogène (Cano-Nicolau et al., 2016). Bien que les profils métaboliques ne soient pas bien connus dans le modèle poisson zèbre, il est reconnu que ces substances sont biotransformées en dérivés œstrogéniques actifs chez les mammifères.

Dans l'essai EASZY, les androgènes aromatisables tels que la testostérone et le méthyle-testostérone induisent la GFP. Cette régulation androgénique du gène *cyp19a1b* est strictement liée au récepteur à œstrogène et n'implique en aucun cas le récepteur à androgène, ni les éléments de réponse androgéniques (Mouriec et al., 2009); cette régulation est due à l'aromatase de la testostérone et du méthyle testostérone en œstradiol et méthyle œstradiol, respectivement. De plus, certains androgènes aromatisables, mais pas tous, induisent la GFP via le récepteur à œstrogène. C'est le cas notamment du 5 α -dihydrotestostérone (DHT). Il a été démontré *in vitro* que la stimulation transcriptionnelle du gène *cyp19a1b* par la DHT se produit en présence du récepteur à œstrogène du poisson zèbre et non en présence du récepteur à androgène du poisson zèbre. En revanche, la 11-kétotestostérone (11-KT), un autre androgène non-aromatisable n'a pas induit l'activité transcriptionnelle du gène *cyp19a1b* (Mouriec et al., 2009). *In vivo* la DHT induit aussi de façon efficace l'expression du gène *cyp19a1b* dans le cerveau de poisson zèbre, contrairement à la 11-KT. *In vivo*, l'activité œstrogénique de la DHT peut être bloquée par ICI 182 780 (un antagoniste du récepteur à œstrogène), mais ce n'est pas le cas de la flutamide (un antagoniste du récepteur à androgène). L'activité œstrogénique de la DHT peut être due à la conversion en β diol via l'activité de la 3 β -hydroxysteroid déshydrogénase. β diol induit une activité transcriptionnelle de l'expression de l'aromatase du cerveau *in vitro*, un effet bloqué par la ICI 182 780, qui suggère l'implication d'un récepteur à œstrogène fonctionnel (Mouriec et al., 2009). En somme, la 11-KT est totalement inefficace dans la stimulation de l'expression de l'aromatase B, mais la DHT peut induire des effets œstrogéniques probablement à la suite d'une biotransformation en β diol à travers via l'activité de la 3 β -hydroxysteroid déshydrogénase (Mouriec et al., 2009).

ANNEXE 4 Aperçu de l'essai EASZY



Graphique 1 : Schéma illustrant les principales étapes de l'essai EASZY.

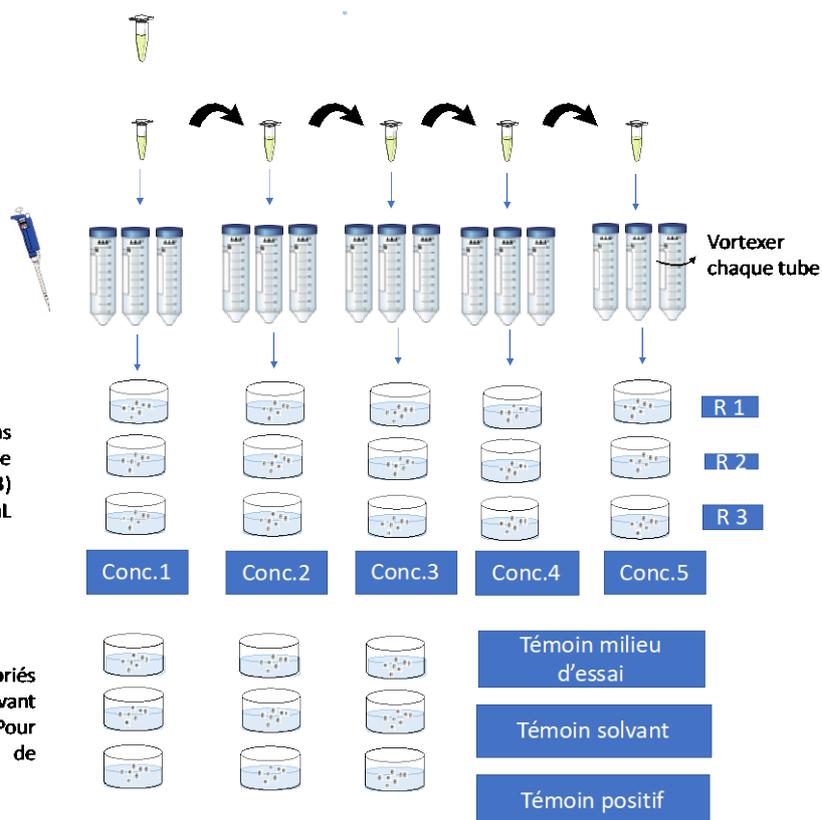
1. Solution mère de produit chimique d'essai (DMSO), -20°C

2. Préparation de la gamme de concentrations : dilutions en série dans le DMSO

3. Préparation des solutions d'essai : ajouter 1.5 µL de solution de produit chimique d'essai dans 15 mL de milieu d'essai. Chaque tube est vortexé

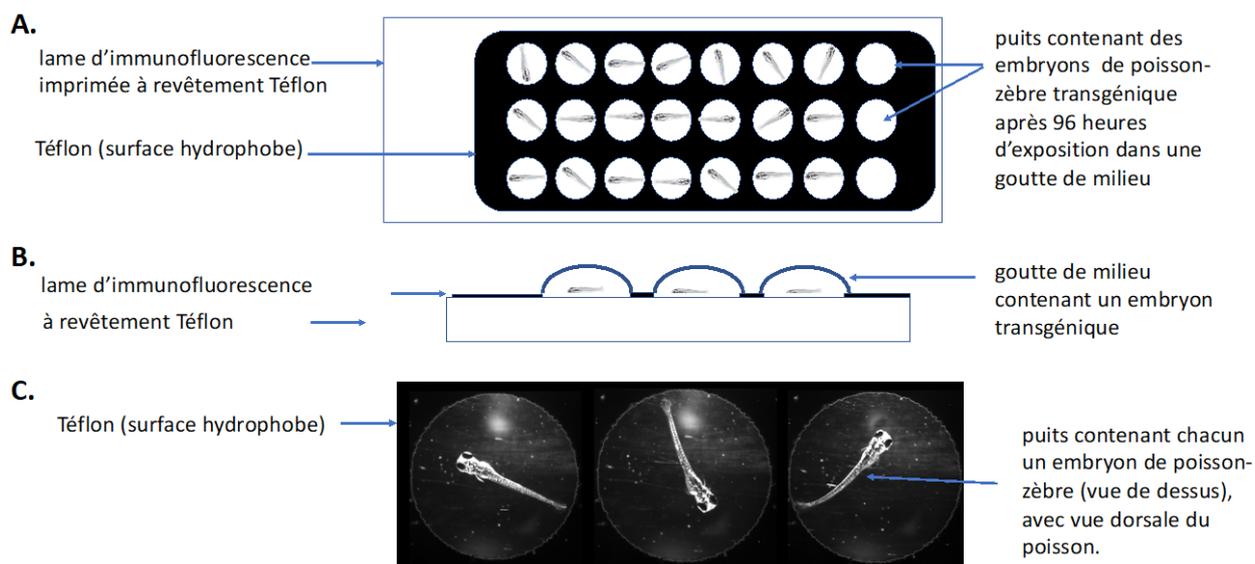
4. Transfert des solutions d'essai dans chaque récipient d'exposition. Pour chaque concentration, 3 réplicats (R1, R2, R3) contenant 7 embryons chacun dans 15 mL de milieu sont utilisés

5. Pour chaque essai, des témoins appropriés sont réalisés : témoins milieu d'essai, solvant et positif (EE2 à 0.05 nM ou 14.8 ng/L). Pour chaque condition témoin, 3 réplicats de 7 embryons chacun sont utilisés.



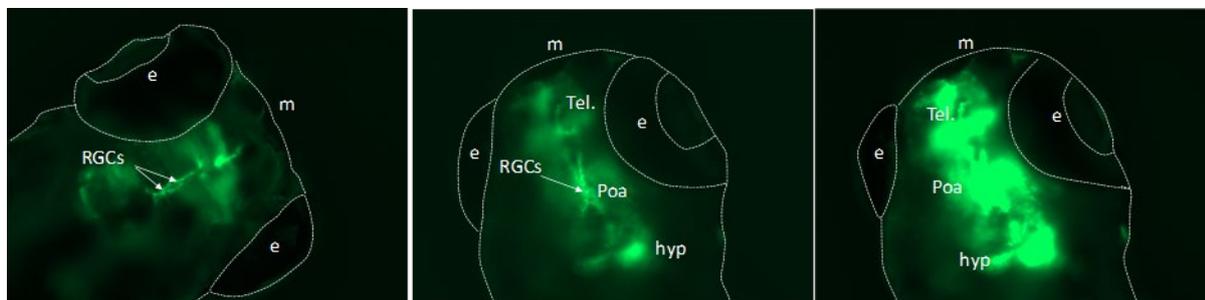
Graphique 2 : Détails de la préparation des concentrations d'essai lorsqu'un solvant est requis.

ANNEXE 5 Analyse des images : vues détaillées d'une lame d'immunofluorescence contenant des embryons de poisson-zèbre transgénique après 96 heures d'exposition

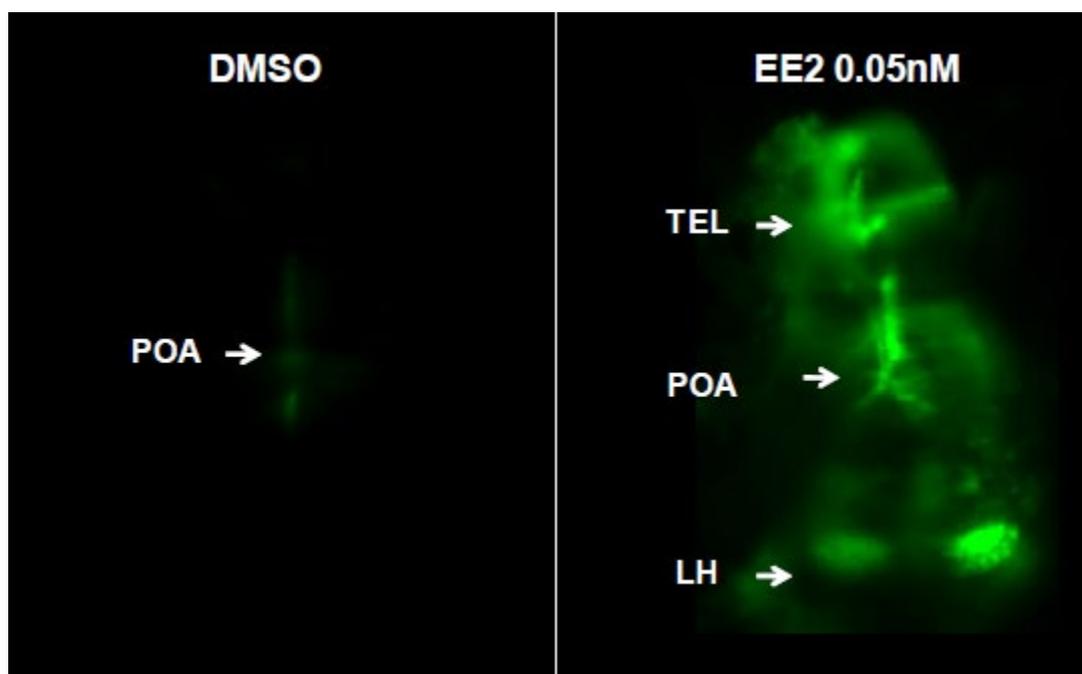


Graphique 1 : **A.** Vue de dessus d'une lame d'immunofluorescence imprimée 24 puits à revêtement Téflon (lame de diagnostic imprimée Téflon 24 puits Immuno-Cell, par exemple). **B.** Vue latérale d'une lame d'immunofluorescence montrant que chaque embryon de poisson-zèbre transgénique est placé dans une goutte de milieu. **C.** Vue de dessus de puits contenant chacun un embryon de poisson-zèbre transgénique, avec vue dorsale de la tête. Chaque embryon doit être vu dorsalement, pour que l'expression de la GFP dans le cerveau puisse être observée correctement.

ANNEXE 6 Imagerie par fluorescence *in vivo* d'embryons de poisson-zèbre transgénique après 96 heures d'exposition



Graphique 1 : Imagerie par fluorescence *in vivo* de poissons-zèbres transgéniques tg(cyp19a1b:GFP) vivants exprimant différents niveaux de GFP (du plus faible à gauche au plus élevé à droite). Vues dorsales (partie antérieure en haut de l'image). e (eye) : œil, m (mouth) : bouche, RGC (radial glial cells) : cellules gliales radiales. Les flèches indiquent le corps cellulaire des RGC le long du ventricule. Sur ces images, la GFP peut être observée dans différentes régions du cerveau : le télencéphale (Tel), l'aire préoptique (Poa, preoptic area) et l'hypothalamus (hyp). Des « temps d'exposition » différents ont été utilisés pour prendre ces images, qui n'étaient pas destinées à quantifier la GFP à des fins de comparaison de l'intensité entre ces individus.



Graphique 2 : imagerie *in vivo* d'embryons de poisson-zèbre transgénique tg(cyp19a1b:GFP) exposés au solvant seul (DMSO) et au produit chimique de référence 17 α éthinyloestradiol (EE2) à une concentration finale de 14.8 ng/L (0.05 nM). Vues dorsales (partie antérieure en haut de l'image) du télencéphale (TEL), de l'aire préoptique (POA) et du lobe inférieur de l'hypothalamus (LH). Ces images ont été prises avec les mêmes paramètres pour l'analyse par fluorescence. Dans cet exemple spécifique, l'induction mesurée chez les embryons exposés à l'EE2 était 25 fois plus élevée que chez le témoin solvant.

ANNEXE 7 Imagerie *in vivo* du poisson-zèbre tg(cyp19a1b:GFP) : microscopie de fluorescence à champ large

Réglage des paramètres du microscope de fluorescence

L'imagerie de fluorescence est réalisée avec un microscope de fluorescence équipé d'un objectif 10X, d'un filtre GFP, d'une source lumineuse externe (ampoule HBO, par exemple) et d'un appareil photo adapté à l'imagerie de fluorescence. Le microscope utilisé peut être droit ou inversé.

Le réglage des paramètres pour l'acquisition des images en fluorescence est délicat, et dépend des caractéristiques techniques principales du microscope. Une fois réglés, les paramètres doivent être conservés pour tous les essais.

Objectif : un objectif grossissant 10X permet de photographier la tête de l'embryon (définie comme la région d'intérêt, ROI) en évitant de photographier le sac vitellin, qui fluoresce à des longueurs d'onde proches de celle de la GFP. L'utilisation d'un objectif spécial pour applications en fluorescence (Fluar, par exemple) est vivement recommandée.

Filtre GFP : les caractéristiques suivantes sont vivement recommandées pour le filtre GFP : longueur d'onde d'excitation 470 nm [Bande Passante 450-490] ; longueur d'onde d'émission 525 nm [BP 505-545]. Pour chacune de ces longueurs d'onde, la bande passante est basse, sans chevauchement entre les spectres d'excitation et d'émission.

Source lumineuse externe : diverses sources de lumière peuvent être utilisées. Il s'agit dans bien des cas d'une ampoule HBO. Pendant la durée de vie de l'ampoule (qui ne dépasse pas 500 heures), il importe que l'intensité soit constante. Cependant, la stabilité de la source lumineuse externe peut être évaluée avant et après une série de mesures, au moyen d'une lame d'étalonnage pour microscope à fluorescence.

Appareil photo pour l'imagerie de fluorescence : on utilisera un appareil haute résolution à capteur CCD (*Charge Coupled Device*, dispositif à transfert de charge) hautement sensible. Un appareil numérique monochrome (noir et blanc) (CCD) est recommandé, car il offre une sensibilité supérieure et un temps d'exposition réduit par rapport aux appareils couleur.

Temps d'exposition : le temps d'exposition doit être optimisé pour chaque microscope, afin d'obtenir le meilleur rapport signal/bruit.

Pour régler ce paramètre, il est recommandé de le faire varier et d'évaluer son influence sur la fluorescence émise par des embryons non exposés et exposés. À cet effet, il est recommandé de conduire un essai sur au moins deux groupes : un témoin milieu d'essai et un témoin positif (EE2, 14.8 ng/L). À la fin de l'expérience, chaque poisson est photographié à différents temps d'exposition (de 50 ms à 300 ms, par exemple, à des intervalles de temps réguliers), puis les images sont analysées afin de déterminer le temps d'exposition optimal. Si le temps d'exposition est réglé convenablement, il doit permettre de détecter une fluorescence tant chez les témoins que chez les poissons exposés. S'il est trop court, la fluorescence de fond ne sera pas détectée correctement. S'il est trop long, le signal sera saturé pour les embryons chez lesquels le niveau d'expression de la GFP est élevé. Le temps d'exposition optimal devra se traduire par un rapport signal/bruit optimal.

ANNEXE 8 Imagerie *in vivo* du poisson-zèbre tg(cyp19a1b:GFP) : analyse d'images avec la macro J EASZY_FAST

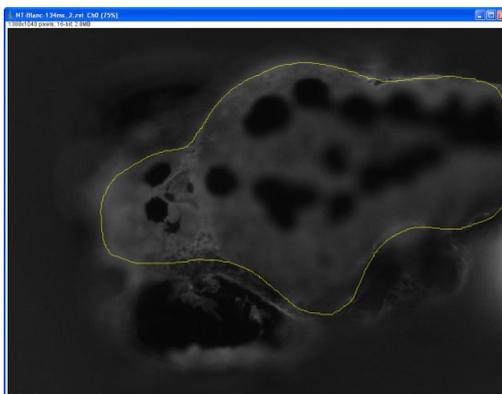
Dans l'essai EASZY, la fluorescence émise par les embryons de poissons est quantifiée d'après les images prises au microscope à fluorescence (voir l'Annexe 7). Les tâches d'analyse d'image ont été entièrement automatisées pour permettre d'analyser rapidement un grand nombre d'images. Les analyses sont réalisées grâce à une macro ImagJ en accès libre, développée spécialement pour l'essai EASZY (*EASZY_FAST macro*). Elle est disponible à l'adresse <https://imagej.net/FAST>

Le fonctionnement de la macro est expliqué dans ce qui suit. Un paramètre utilisé dans l'analyse d'image correspond à une valeur seuil qui permet de distinguer l'autofluorescence des embryons de la fluorescence du gène rapporteur. Ce paramètre doit être déterminé avant de quantifier la GFP chez les poissons exposés à des substances de référence ou à des substances inconnues.

1. Détermination du seuil de niveau de gris

Un critère décisif pour l'analyse d'image est le seuil de niveau de gris. Il correspond à une valeur de gris permettant de faire la distinction entre la fluorescence due à la protéine fluorescente rapporteur et l'autofluorescence naturelle des poissons (fluorescence de fond). Pour déterminer ce paramètre, la procédure suivante a été établie :

- a) Sélectionner des poissons-zèbres non transgéniques et les photographier après avoir réglé les paramètres comme indiqué ci-dessus (voir le graphique 1).
- b) Importer les photographies dans le logiciel d'analyse d'image.
- c) Définir manuellement une région d'intérêt (ROI). Elle correspond aux régions du cerveau où est normalement observée l'expression de la GFP chez le poisson-zèbre transgénique tg(cyp19a1b:GFP).
- d) Analyser chaque ROI afin d'obtenir le niveau de gris de chaque pixel dans la zone sélectionnée.
- e) Le seuil est défini comme le niveau de gris maximal trouvé dans la ROI des poissons non transgéniques. Pour affiner cette valeur, il est recommandé d'analyser plusieurs poissons non transgéniques.



Graphique 1 : Imagerie de fluorescence d'un embryon de poisson-zèbre non transgénique, servant à mesurer le niveau de fluorescence de fond (valeur seuil du niveau de gris).

Une fois la valeur seuil définie, seuls les pixels ayant un niveau de gris supérieur au seuil seront analysés. Cette valeur seuil est propre à chaque équipement de microscopie en fluorescence, car l'échelle de gris varie en fonction de l'appareil photo utilisé pour la capture d'images et de la résolution de l'image (8, 12, 16 bits/pixel, par exemple). Ce seuil de niveau de gris est stable dans le temps, mais peut être ajusté en cas de modifications apportées à l'équipement, telles que l'installation d'une nouvelle source de lumière.

2. Description générale de la macro ImageJ EASZY_FAST

Configuration minimale du système

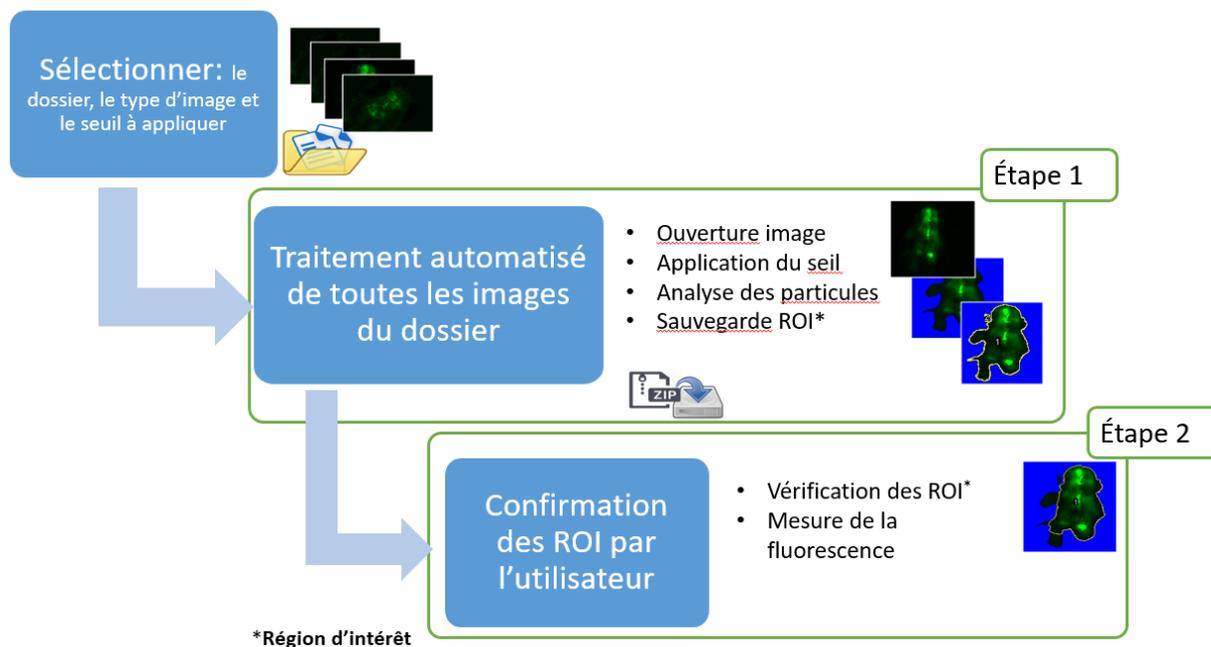
Ressources logicielles nécessaires pour utiliser la macro EASZY_FAST :

- ImageJ version 1.53 ou supérieure - <https://imagej.net/Download> or <https://imagej.net/Fiji>
- Java 8 ou supérieur - www.java.com
- Bio-Formats 6.6.1 ou supérieur <http://www.openmicroscopy.org/bio-formats/> (plugin pour la lecture et l'écriture de formats de fichiers images utilisés dans les sciences de la vie)
- EASZY_FAST_Analyze.ijm fichier enregistré dans le dossier Plugins dans ImageJ (disponible à l'adresse suivante : <https://imagej.net/FAST>) (voir les détails pour une installation automatique)

On trouvera plus d'informations sur d'autres systèmes d'exploitation via les liens ci-dessus.

Description du pipeline de traitement d'image de la macro « EASZY_FAST » (graphique 2) :

Graphique 2 : Processus d'analyse des images



La macro ImageJ exécute plusieurs tâches automatiquement (ouverture, application du seuil, sauvegarde, mesure), ce qui permet de traiter un grand nombre d'images.

- Étape 1 – Traitement par lot du répertoire sélectionné
 - Liste tous les fichiers contenant les extensions définies par l'utilisateur (.czi - .zvi - .tif - .nd2) dans le dossier sélectionné et les sous-dossiers.
 - Applique le seuil défini par l'utilisateur (valeur par défaut : 290) et analyse les particules au-dessus du seuil.
 - Regroupe les pixels dépassant le seuil en une région d'intérêt (*Region of Interest*, ROI) et sauvegarde cette ROI dans un fichier zip du répertoire d'images.
- Étape 2 – Vérification de la ROI sélectionnée et mesure
 - Ouverture des images une par une pour vérifier la ROI définie automatiquement.
 - L'utilisateur peut confirmer la ROI, la modifier directement ou écarter l'image de la suite de l'analyse.

Description détaillée des étapes d'analyse des images

Exécuter **ImageJ.exe**.

Lancer la macro dans la barre de menu ImageJ :

Plugins\

FAST

FAST_Analyze

La macro invite à sélectionner le dossier contenant les fichiers images.

Le dossier sélectionné et tous les sous-dossiers seront traités en vue de l'analyse.

La macro affiche une boîte de dialogue permettant de définir les options d'analyse :

Threshold value (valeur seuil) – limite inférieure d'intensité des pixels, segmentant l'image en éléments d'intérêt (au-dessus du seuil) et arrière-plan.

Une valeur seuil doit être définie pour chaque système d'acquisition (microscope + appareil photo + temps d'exposition).

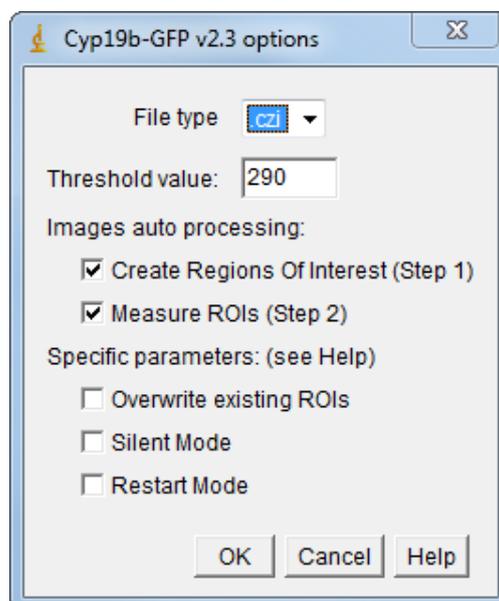
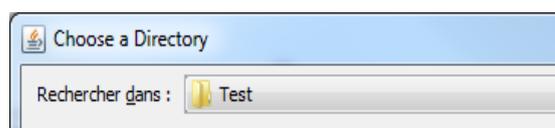
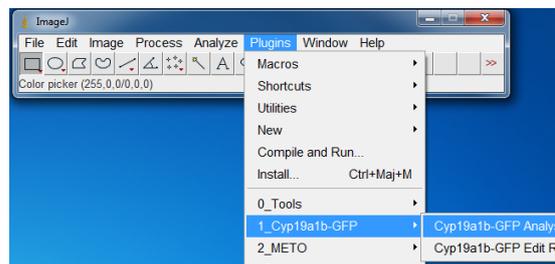
File type (type de fichier) – format des fichiers image, à savoir CZI, ZVI (Zeiss Vision Image), ND2 (Nikon) ou TIFF (Tagged Image File Format).

Create Regions Of Interest (Step 1) (créer les ROI (Étape 1)) – cocher cette case pour obtenir l'analyse des pixels au-dessus de la valeur seuil définie et la sauvegarde automatique du fichier zip des ROI dans le dossier d'images (graphique).

Measure ROIs (Step 2) (mesurer les ROI (Étape 2)) – cocher cette case pour activer la vérification et la mesure de chaque ROI précédemment créée. Pour réanalyser d'anciennes données, cocher l'étape 2 sans cocher l'étape 1.

Overwrite existing ROIs (remplacer ROI existantes) – Si cette option est cochée, la macro écrasera les fichiers zip anciens sans que la question soit posée chaque fois à l'utilisateur.

Silent Mode (mode silencieux) – Si cette option est cochée, la macro mesurera toutes les images et les ROI associées sans que la question soit posée



chaque fois à l'utilisateur. Utile pour réanalyser d'anciennes données.

Restart Mode (mode relance) – si le traitement automatique est annulé accidentellement, ce mode vérifie si une ROI a été créée et en crée une s'il y a lieu.

Une fois terminée l'étape 1 du traitement d'images, les images et les ROI correspondantes sont vérifiées par l'utilisateur.

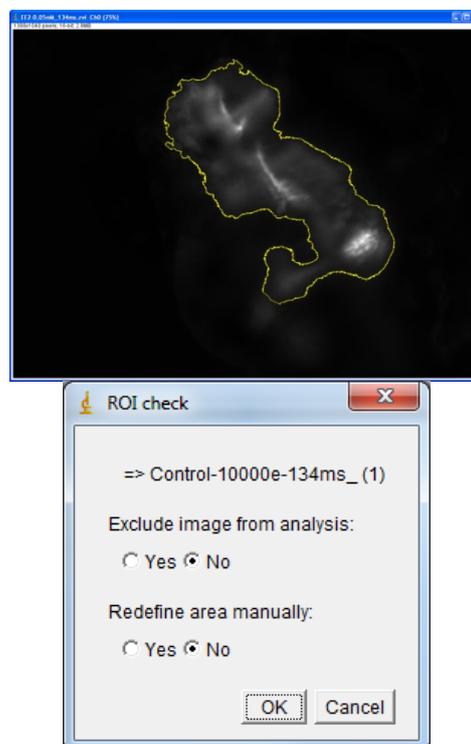
Une boîte de dialogue s'affiche pour valider la ROI. Si la région est correcte, l'utilisateur clique sur



pour passer à l'image suivante.

La boîte de dialogue permet d'exclure l'image courante de l'analyse (exclude image from analysis) (si elle est floue, par exemple) **OU** de redéfinir manuellement la zone sélectionnée (redefine area manually).

Cliquer sur le bouton radio s'il y a lieu, puis sur ou **ENTER** pour continuer



Si vous avez coché « redéfinir manuellement la zone », une nouvelle boîte de dialogue s'affiche ; elle permet d'accéder à la barre d'outils ImageJ et de modifier la sélection jaune. Le seuil défini par l'utilisateur est appliqué automatiquement.

Sélectionner l'outil approprié dans la barre d'outils ImageJ :

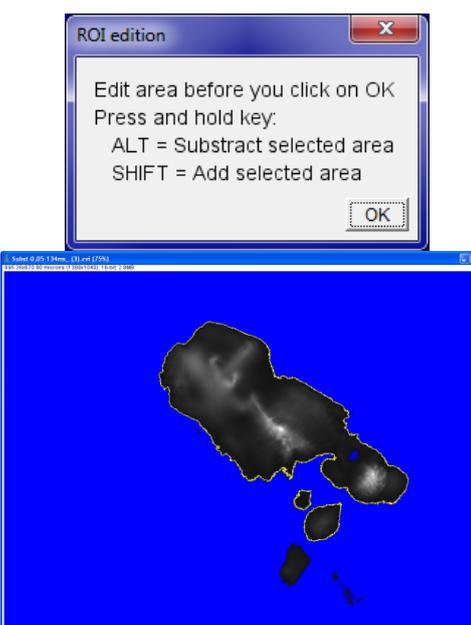
Freehand (à main levée, option par défaut)

OU Wand tool (baguette).

Pour retirer une zone de fluorescence non spécifique (vitellus, par exemple), utiliser l'outil

Freehand et maintenir la touche enfoncée pendant que vous sélectionnez la zone à retirer de la ROI.

Pour ajouter une zone à la ROI sélectionnée, maintenir la touche enfoncée pendant que vous sélectionnez la zone à ajouter.



Cliquer sur  pour valider la nouvelle ROI : l'image est alors mesurée et le fichier zip est mis à jour automatiquement.

Si la sélection est vide après correction manuelle, la macro écarte l'image de l'analyse.

Une fois terminée l'étape 2, une liste de toutes les images mesurées avec leur nom de fichier est affichée dans la fenêtre Result Table (tableau de résultats) d'ImageJ.

Ce tableau peut être sauvegardé automatiquement au format csv ou xls dans le dossier sélectionné au départ.



The screenshot shows the "Results" window in ImageJ, displaying a table with the following columns: Label, Area, Mean, StdDev, Min, Max, HtDen, RswrDen, MinTr, and MaxTr. The table contains 32 rows of data, representing different image measurements.

Label	Area	Mean	StdDev	Min	Max	HtDen	RswrDen	MinTr	MaxTr
1 Control-10000e-134ms_(1).tif	4060	394	113	290	1021	1598398	3842070	290	1021
2 Control-10000e-134ms_(2).tif	5138	376	98	290	977	1927538	4632222	290	977
3 Control-10000e-134ms_(3).tif	16364	408	118	290	1228	6689257	16064062	290	1228
4 Control-10000e-134ms_(4).tif	22438	417	132	290	1462	9548295	22425997	290	1462
5 Control-10000e-134ms_(5).tif	2371	365	71	290	689	864864	2078874	290	689
6 Control-10000e-134ms_(6).tif	2606	363	70	290	614	946007	2273918	290	614
7 Control-10000e-134ms_(7).tif	22605	445	153	290	1869	10149894	24397299	290	1869
8 Control-10000e-134ms_.tif	2924	374	89	290	774	1094866	2631730	290	774
9 Subst-0,0015625-134ms_(1).tif	7281	344	50	290	559	2501197	6012103	290	559
10 Subst-0,0015625-134ms_(10).tif	8721	376	119	290	1089	3282779	7830815	290	1089
11 Subst-0,0015625-134ms_(11).tif	7144	383	112	290	1191	2737677	6980553	290	1191
12 Subst-0,0015625-134ms_(2).tif	18786	421	136	290	1054	7914149	19323298	290	1054
13 Subst-0,0015625-134ms_(3).tif	4215	365	89	290	977	1539124	3699591	290	977
14 Subst-0,0015625-134ms_(4).tif	2371	352	65	290	742	634219	2005213	290	742
15 Subst-0,0015625-134ms_(5).tif	25436	431	162	290	1929	10969410	26387169	290	1929
16 Subst-0,0015625-134ms_(6).tif	53369	475	211	290	2434	25227715	60880225	290	2434
17 Subst-0,0015625-134ms_(7).tif	27798	451	196	290	2266	12542800	30149127	290	2266
18 Subst-0,0015625-134ms_(8).tif	6217	416	185	290	1646	2585315	6214322	290	1646
19 Subst-0,0015625-134ms_(9).tif	6052	408	119	290	1203	2469984	5937101	290	1203
20 Subst-0,0015625-134ms_.tif	22568	399	129	290	1262	5001830	21637697	290	1262
21 Subst-0,003125-134ms_(1).tif	41234	476	265	290	2659	19607990	47133666	290	2659
22 Subst-0,003125-134ms_(10).tif	16250	412	179	290	1608	6697899	16099740	290	1608
23 Subst-0,003125-134ms_(11).tif	35641	441	178	290	1992	15701138	37740822	290	1992
24 Subst-0,003125-134ms_(12).tif	4036	388	76	290	789	1444225	3471003	290	789
25 Subst-0,003125-134ms_(15).tif	6785	393	119	290	997	2666793	6410771	290	997
26 Subst-0,003125-134ms_(2).tif	4313	367	75	290	720	1584047	3807874	290	720
27 Subst-0,003125-134ms_(3).tif	9996	414	175	290	1480	4139920	9951125	290	1480
28 Subst-0,003125-134ms_(4).tif	7260	379	97	290	965	2748857	6608650	290	965
29 Subst-0,003125-134ms_(5).tif	18231	444	180	290	1918	8898996	19468835	290	1918
30 Subst-0,003125-134ms_(6).tif	48200	502	206	290	1865	24179395	58119919	290	1865
31 Subst-0,003125-134ms_(7).tif	12410	388	113	290	1142	4816819	11578187	290	1142
32 Subst-0,003125-134ms_(8).tif	92548	484	256	290	2814	15755465	37871408	290	2814

ANNEXE 9 Présentation et analyse des données

L'Annexe 9 donne un exemple de présentation des données obtenues par l'essai EASZY.

1. Variabilité observée dans les mesures de la GFP et les réponses obtenues chez les témoins solvant, milieu d'essai et positif par des laboratoires indépendants participant à l'étude d'interétalonnage.

Le tableau 1 présente les mesures de la GFP (exprimées en facteur multiplicatif de l'induction par rapport au solvant) dans les groupes témoins, obtenues lors d'essais indépendants dans quatre laboratoires. Ces données illustrent la variabilité des mesures de la GFP dans les groupes témoins, que l'on retrouve de façon cohérente tant entre essais qu'entre laboratoires. Le coefficient de variation (CV, %) dans le groupe solvant et le groupe milieu d'essai est élevé, ce qui reflète sans doute la variabilité de l'expression du gène de l'aromatase cérébrale lors du développement du poisson-zèbre, et la variabilité de la méthode de mesure *in vivo* de la GFP par imagerie de fluorescence. Néanmoins, la puissance statistique de l'essai EASZY est élevée, indiquant sa capacité à détecter une différence entre groupes témoins et exposés.

Tableau 1. Exemple de variabilité de la mesure de la GFP dans différents laboratoires lors de trois essais indépendants. Pour chaque laboratoire, la GFP (exprimée en facteur multiplicatif de l'induction par rapport au solvant) \pm l'écart type (ET) est indiquée pour le solvant, le milieu d'essai et le témoin positif (EE2 14.8 ng/L). Le coefficient de variation (CV) est exprimé en %.

	Lab A			Lab B			Lab C			Lab D		
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Témoin solvant												
Moyenne	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ET	0.4	0.6	0.5	0.6	0.5	0.6	0.7	0.7	0.7	0.4	0.5	0.6
CV (%)	42.6	58.2	45.8	64.7	48.5	60.0	67.1	66.9	73.9	44.1	45.2	64.4
Témoin milieu d'essai												
Moyenne	1.0	0.8	0.9	1.4	1.4	0.9	1.0	1.4	1.3	0.9	1.0	1.2
ET	0.5	0.5	0.6	1.2	0.9	0.7	0.7	0.9	1.1	0.3	0.6	0.6
CV (%)	55.1	60.2	68.8	89.7	65.7	74.3	69.2	61.1	83.6	33.7	59.8	46.4
Témoin positif												
Moyenne	17.2	24.1	20.5	13.9	9.4	9.6	29.4	15.0	22.3	10.3	9.9	17.0
ET	4.9	8.4	7.7	2.1	2.2	3.2	9.4	4.2	7.8	4.0	2.9	4.7
CV (%)	28.3	35.0	37.4	15.1	23.6	33.0	31.8	27.8	35.0	38.7	29.2	27.5

2. Exemple type de données obtenues lors d'un essai EASZY

Dans cet exemple, une substance « A » a été testée à 5 concentrations différentes (de la concentration la plus basse Conc. 1 à la plus élevée Conc. 5).

Trois groupes témoins différents ont été utilisés : témoin solvant, témoin milieu d'essai (eau reconstituée ISO), témoin positif (EE2 14.8 ng/L).

Dans chaque groupe traité, le taux de survie et le taux d'éclosion sont indiqués, ainsi que le nombre d'embryons analysés par imagerie de fluorescence.

Dans cet exemple, le test est valide, car :

- I. Les taux de survie et d'éclosion chez les témoins remplissent les critères de validité définis pour ces paramètres (voir le paragraphe 25)
- II. L'induction de GFP mesurée moyenne chez le témoin positif est > 9, ce qui signifie que le témoin positif est valide
- III. Les taux de mortalité dans les groupes exposés sont conformes au critère d'acceptabilité défini au paragraphe 48. Toutes les concentrations sont utilisées pour analyser l'effet du produit chimique d'essai.

RawintDen = intensité de fluorescence d'un embryon (sur la base de l'analyse d'image ; voir l'Annexe 8)

GFP (facteur multiplicatif)

$$= \frac{\text{intensité de fluorescence mesurée dans un embryon}}{\text{moyenne de l'intensité de fluorescence mesurée dans le groupe témoin}}$$

$$\text{Taux de survie (\%)} = \frac{\text{Nombre d'embryons vivants à 96 haf}}{\text{Nombre total d'embryons dans le répliquat}} \times 100$$

$$\text{Taux d'éclosion (\%)} = \frac{\text{nombre d'embryons éclos à 96 haf}}{\text{nombre total d'embryons vivants à 96 haf}} \times 100$$

Tableau 2 : Exemple de données issues d'un essai EASZY

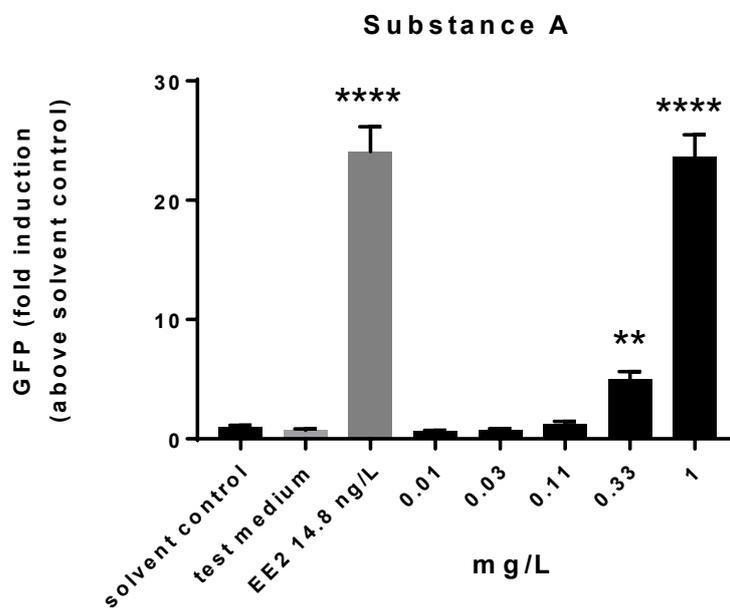
Condition	Replicate # (R#)	# individual	Label	RawIntDen	GFP (fold)	Mean GFP (fold)	SD	n /replicate	Survival rate (%)	Hatching rate (%)	Mean (RawIntDen R1+R2+R3)	Mean GFP (fold) (R1-R2-R3)	Standard Deviation
Solvent group	1	1	DMSO_R1_	4 874 116	0,8	0,74	0,34	7	100	100	5 980 768	1,00	0,41
		2	DMSO_R1_	6 654 906	1,1								
		3	DMSO_R1_	622 207	0,1								
		4	DMSO_R1_	4 076 376	0,7								
		5	DMSO_R1_	6 779 792	1,1								
		6	DMSO_R1_	3 912 076	0,7								
		7	DMSO_R1_	4 281 717	0,7								
	2	1	DMSO_R2	11 635 508	1,9	1,27	0,51	6	86	100			
		2	DMSO_R2	9 900 998	1,7								
		3	DMSO_R2	4 210 012	0,7								
		4	DMSO_R2	5 674 354	0,9								
		5	DMSO_R2	5 865 124	1,0								
		6	DMSO_R2	6 687 435	1,1								
	3	1	DMSO_R3	4 940 098	0,8	1,07	0,31	6	86	100			
		2	DMSO_R3	6 396 897	1,1								
		3	DMSO_R3	7 158 886	1,2								
		4	DMSO_R3	7 239 720	1,2								
		5	DMSO_R3	8 961 822	1,5								
6		DMSO_R3	3 762 552	0,6									
water control (ISO water)	1	1	ISO_Water_R1	2 666 553	0,4	1,24	0,42	7	100	100	6 986 430	1,17	0,42
		2	ISO_Water_R1	6 351 281	1,1								
		3	ISO_Water_R1	9 904 374	1,7								
		4	ISO_Water_R1	7 550 167	1,3								
		5	ISO_Water_R1	6 793 603	1,1								
		6	ISO_Water_R1	9 486 469	1,6								
		7	ISO_Water_R1	9 148 253	1,5								
	2	1	ISO_Water_R2	5 156 341	0,9	1,18	0,53	7	100	100			
		2	ISO_Water_R2	10 897 349	1,8								
		3	ISO_Water_R2	7 533 429	1,3								
		4	ISO_Water_R2	5 025 053	0,8								
		5	ISO_Water_R2	4 776 223	0,8								
		6	ISO_Water_R2	3 997 141	0,7								
		7	ISO_Water_R2	11 819 339	2,0								
	3	1	ISO_Water_R3	5 842 230	1,0	1,08	0,36	6	86	100			
		2	ISO_Water_R3	9 431 310	1,6								
		3	ISO_Water_R3	5 757 365	1,0								
		4	ISO_Water_R3	7 308 139	1,2								
		5	ISO_Water_R3	7 338 579	1,2								
		6	ISO_Water_R3	2 945 410	0,5								
	positive control (EE2 14.8 ng/L)	1	1	EE2_0.05nM_R1	71 930 735	12,0	11,69	2,78	7	100	100	84 271 975	14,09
2			EE2_0.05nM_R1	105 122 998	17,6								
3			EE2_0.05nM_R1	53 386 070	8,9								
4			EE2_0.05nM_R1	64 083 240	10,7								
5			EE2_0.05nM_R1	60 552 970	10,1								
6			EE2_0.05nM_R1	68 295 748	11,4								
7			EE2_0.05nM_R1	66 149 186	11,1								
2		1	EE2_0.05nM_R2	102 759 393	17,2	14,24	4,98	7	100	100			
		2	EE2_0.05nM_R2	58 198 318	9,7								
		3	EE2_0.05nM_R2	124 051 865	20,7								
		4	EE2_0.05nM_R2	58 021 914	9,7								
		5	EE2_0.05nM_R2	120 673 117	20,2								
		6	EE2_0.05nM_R2	72 252 446	12,1								
		7	EE2_0.05nM_R2	60 313 370	10,1								
3		1	EE2_0.05nM_R3	112 369 410	18,8	16,34	5,26	7	100	100			
		2	EE2_0.05nM_R3	77 830 991	13,0								
		3	EE2_0.05nM_R3	139 233 203	23,3								
		4	EE2_0.05nM_R3	137 034 544	22,9								
		5	EE2_0.05nM_R3	64 271 974	10,7								
		6	EE2_0.05nM_R3	71 380 413	11,9								
		7	EE2_0.05nM_R3	81 799 575	13,7								

Tableau 2 : (suite)

Condition	Replicate #	# individual	Label	RawIntDen	GFP (fold)	mean GFP	SD	n/replicate	Survival rate	Hatching rate	Mean RawIntDen (R1+R2+R3)	Mean GFP (fold) (R1 R2-R3)	Standard Deviation
Substance A Concentration 1	1	1	substance_C1_R1	13 507 593	2,3	1,89	0,40	7	100	100	10 816 778	1,81	0,66
		2	substance_C1_R1	11 836 562	2,0								
		3	substance_C1_R1	14 976 217	2,5								
		4	substance_C1_R1	10 908 321	1,8								
		5	substance_C1_R1	10 010 384	1,7								
		6	substance_C1_R1	10 036 746	1,7								
		7	substance_C1_R1	7 756 360	1,3								
	2	1	substance_C1_R2	16 527 601	2,8	2,02	0,81	7	100	100			
		2	substance_C1_R2	6 310 398	1,1								
		3	substance_C1_R2	9 783 991	1,6								
		4	substance_C1_R2	14 343 054	2,4								
		5	substance_C1_R2	17 064 048	2,9								
		6	substance_C1_R2	5 417 556	0,9								
		7	substance_C1_R2	14 930 672	2,5								
	3	1	substance_C1_R3	5 615 174	0,9	1,52	0,71	7	100	100			
		2	substance_C1_R3	10 448 075	1,7								
		3	substance_C1_R3	8 869 381	1,5								
		4	substance_C1_R3	14 725 626	2,5								
		5	substance_C1_R3	14 252 784	2,4								
		6	substance_C1_R3	5 568 572	0,9								
		7	substance_C1_R3	4 263 219	0,7								
Substance A Concentration 2	1	1	substance_C2_R1	6 775 729	1,1	1,40	0,54	7	100	100	8 459 415	1,41	0,46
		2	substance_C2_R1	12 434 825	2,1								
		3	substance_C2_R1	4 407 107	0,7								
		4	substance_C2_R1	12 624 433	2,1								
		5	substance_C2_R1	9 470 396	1,6								
		6	substance_C2_R1	7 305 193	1,2								
		7	substance_C2_R1	5 678 952	0,9								
	2	1	substance_C2_R2	4 496 991	0,8	1,32	0,48	7	100	100			
		2	substance_C2_R2	6 987 774	1,2								
		3	substance_C2_R2	7 257 037	1,2								
		4	substance_C2_R2	5 504 582	0,9								
		5	substance_C2_R2	7 767 892	1,3								
		6	substance_C2_R2	12 667 120	2,1								
		7	substance_C2_R2	10 757 400	1,8								
	3	1	substance_C2_R3	9 308 406	1,6	1,52	0,41	7	100	100			
		2	substance_C2_R3	12 899 089	2,2								
		3	substance_C2_R3	9 951 068	1,7								
		4	substance_C2_R3	8 467 905	1,4								
		5	substance_C2_R3	4 795 936	0,8								
		6	substance_C2_R3	7 996 179	1,3								
		7	substance_C2_R3	10 093 706	1,7								
Substance A (concentration 3)	1	1	substance_C3_R1	14 600 703	2,4	1,84	0,49	7	100	100	12 292 910	2,06	0,55
		2	substance_C3_R1	10 101 759	1,7								
		3	substance_C3_R1	7 281 076	1,2								
		4	substance_C3_R1	8 902 999	1,5								
		5	substance_C3_R1	15 269 349	2,6								
		6	substance_C3_R1	10 509 714	1,8								
		7	substance_C3_R1	10 398 688	1,7								
	2	1	substance_C3_R2	14 534 037	2,4	2,14	0,41	6	86	100			
		2	substance_C3_R2	11 519 299	1,9								
		3	substance_C3_R2	8 960 455	1,5								
		4	substance_C3_R2	11 719 652	2,0								
		5	substance_C3_R2	14 867 058	2,5								
		6	substance_C3_R2	15 082 903	2,5								
	3	1	substance_C3_R3	12 646 133	2,1	2,20	0,70	7	100	100			
		2	substance_C3_R3	15 363 363	2,6								
		3	substance_C3_R3	16 852 074	2,8								
		4	substance_C3_R3	13 450 406	2,2								
		5	substance_C3_R3	8 519 588	1,4								
		6	substance_C3_R3	18 274 318	3,1								
		7	substance_C3_R3	7 004 622	1,2								
	Substance A (concentration 4)	1	1	substance_C4_R1	38 287 375	6,4	5,31	1,60	7	100			
2			substance_C4_R1	24 544 667	4,1								
3			substance_C4_R1	29 107 967	4,9								
4			substance_C4_R1	36 096 743	6,0								
5			substance_C4_R1	23 646 007	4,0								
6			substance_C4_R1	22 236 473	3,7								
7			substance_C4_R1	48 271 083	8,1								
2		1	substance_C4_R2	18 592 109	3,1	3,80	1,07	7	100	100			
		2	substance_C4_R2	25 768 398	4,3								
		3	substance_C4_R2	13 015 362	2,2								
		4	substance_C4_R2	32 592 848	5,4								
		5	substance_C4_R2	19 489 317	3,3								
		6	substance_C4_R2	22 694 485	3,8								
		7	substance_C4_R2	26 854 149	4,5								
3		1	substance_C4_R3	12 260 474	2,0	3,67	1,49	7	100	100			
		2	substance_C4_R3	23 377 756	3,9								
		3	substance_C4_R3	19 131 382	3,2								
		4	substance_C4_R3	39 511 235	6,6								
		5	substance_C4_R3	25 386 701	4,2								
		6	substance_C4_R3	15 465 375	2,6								
		7	substance_C4_R3	18 306 430	3,1								
Substance A (concentration 5)	1	1	substance_C5_R1	130 323 975	21,8	17,59	3,71	7	100	100	25 458 397	19,00	4,59
		2	substance_C5_R1	111 652 396	18,7								
		3	substance_C5_R1	117 792 473	19,7								
		4	substance_C5_R1	112 146 114	18,8								
		5	substance_C5_R1	82 246 955	13,8								
		6	substance_C5_R1	67 096 120	11,2								
		7	substance_C5_R1	114 946 079	19,2								
	2	2	substance_C5_R2	108 883 032	18,2	19,37	6,16	5	86	100			
		3	substance_C5_R2	144 832 092	24,2								
		4	substance_C5_R2	131 283 589	22,0								
		5	substance_C5_R2	54 632 538	9,1								
		6	substance_C5_R2	139 580 958	23,3								
		6	substance_C5_R2	139 580 958	23,3								
	3	1	substance_C5_R3	159 768 777	26,7	20,35	4,41	6	86	100			
		2	substance_C5_R3	104 079 657	17,4								
3		substance_C5_R3	125 300 941	21,0									
4		substance_C5_R3	92 586 729	15,5									
5		substance_C5_R3	103 730 320	17,3									
6		substance_C5_R3	144 902 198	24,2									

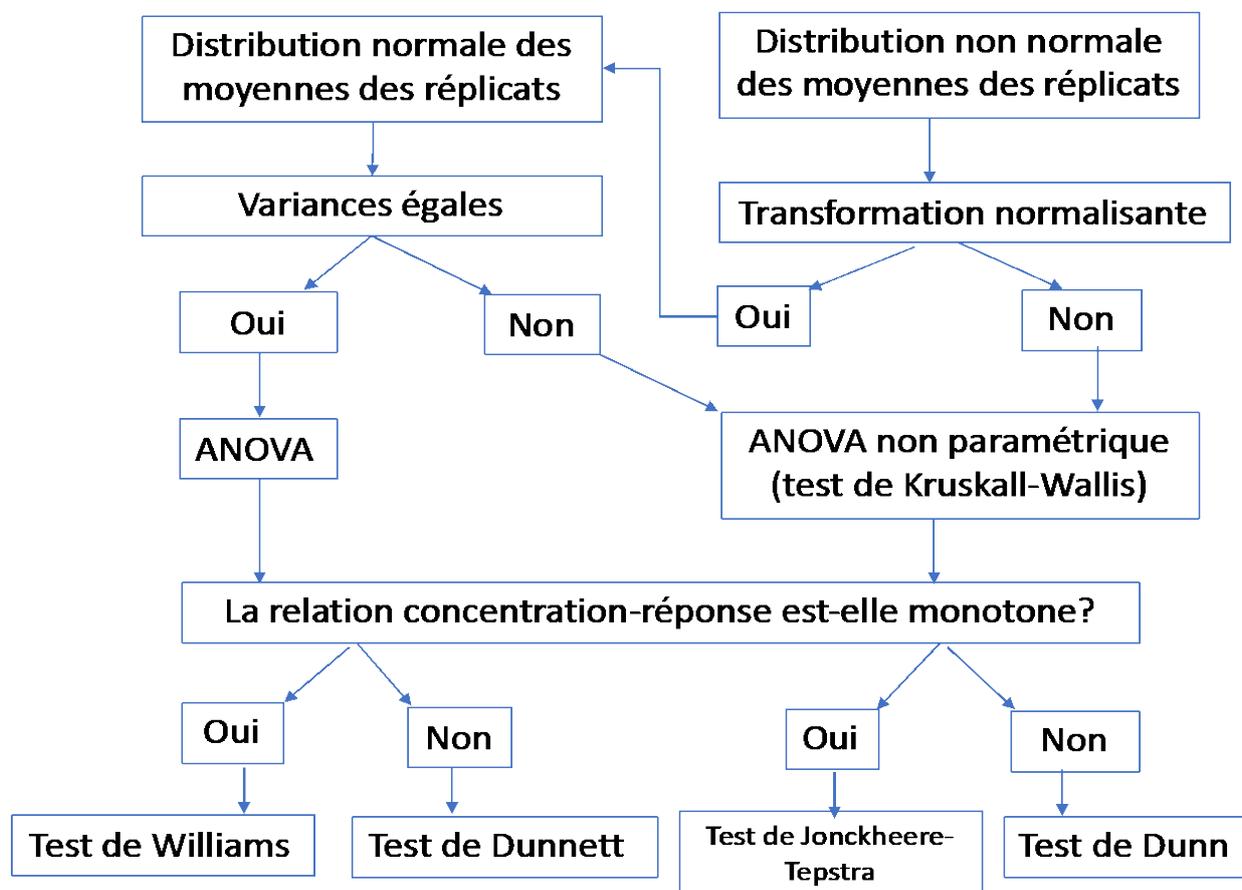
Représentation graphique et analyse des données

Pour identifier l'activité potentielle d'un produit chimique, on compare les réponses entre groupes traités et groupes témoins, par des tests statistiques appropriés (voir le paragraphe 60).



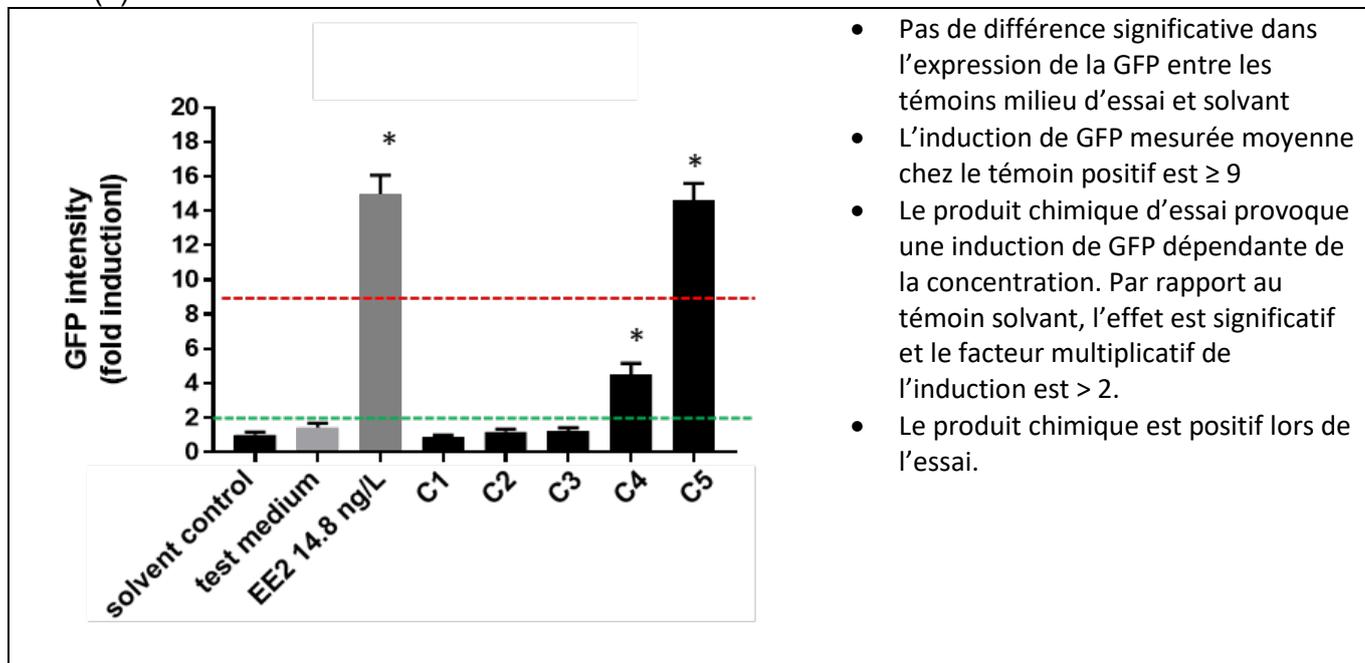
Graphique 1 : expression de la GFP (traduite en facteur multiplicatif moyen de l'induction) \pm écart type. **** ($p=0.0001$) et ** ($p=0.0042$) dénotent des différences significatives par rapport au groupe témoin. La concentration la plus basse de produit chimique d'essai induisant un effet significatif est indiquée, de même que la concentration entraînant l'induction de GFP maximale et le facteur multiplicatif maximal. Le niveau d'induction maximal est de 23.5 fois par rapport au groupe témoin et la concentration induisant l'effet maximal est de 1 mg/L.

ANNEXE 10 Logigramme décisionnel pour l'analyse statistique

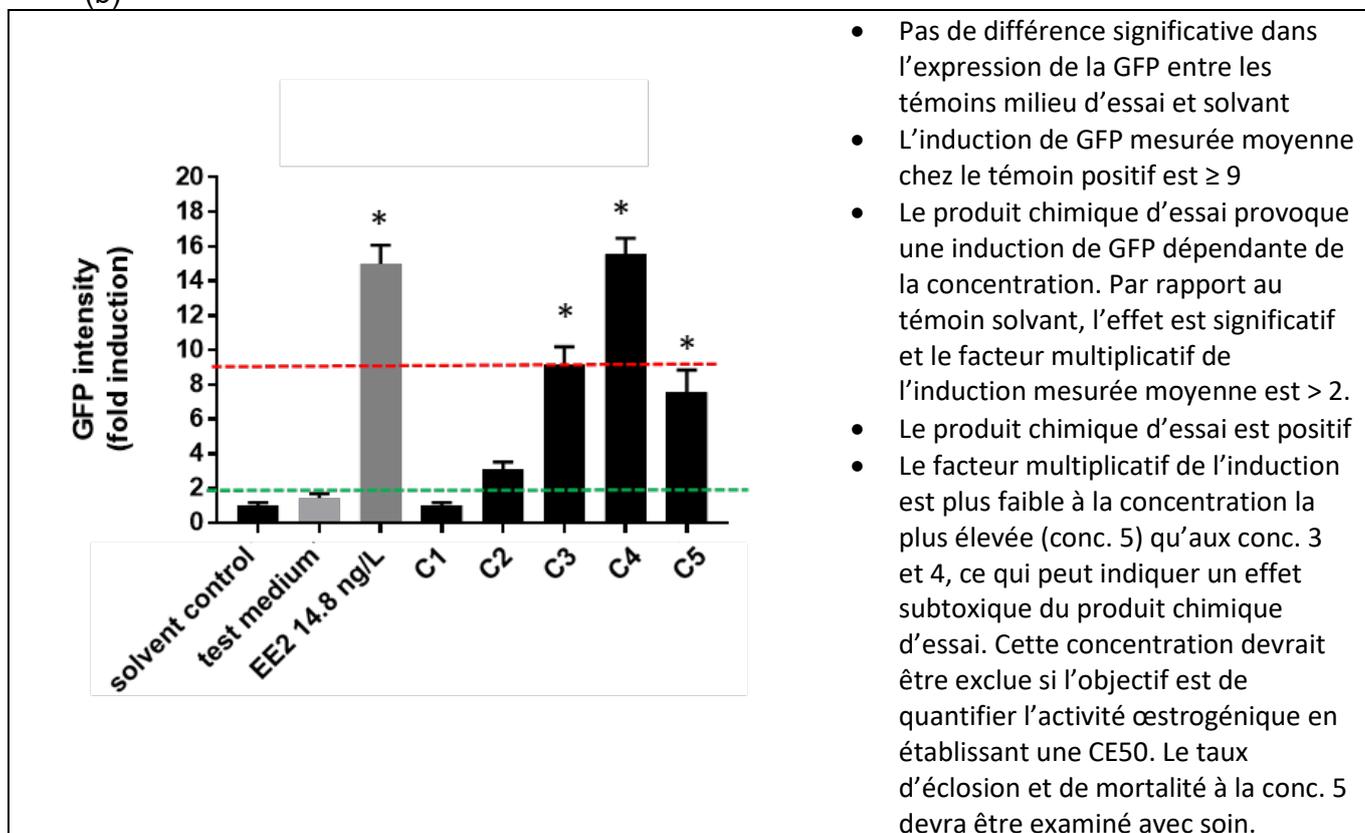


ANNEXE 11 Exemples de courbes concentration-réponse pouvant être obtenues lors de l'essai EASZY : interprétation et recommandations

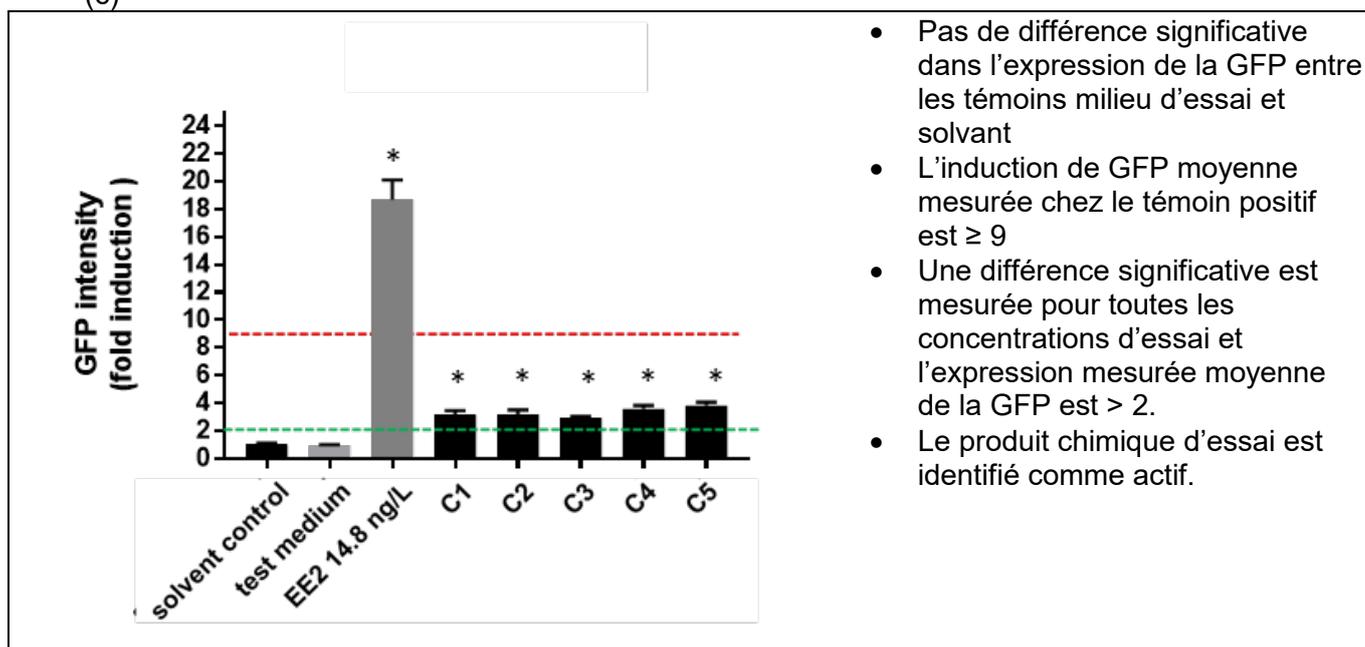
(a)



(b)

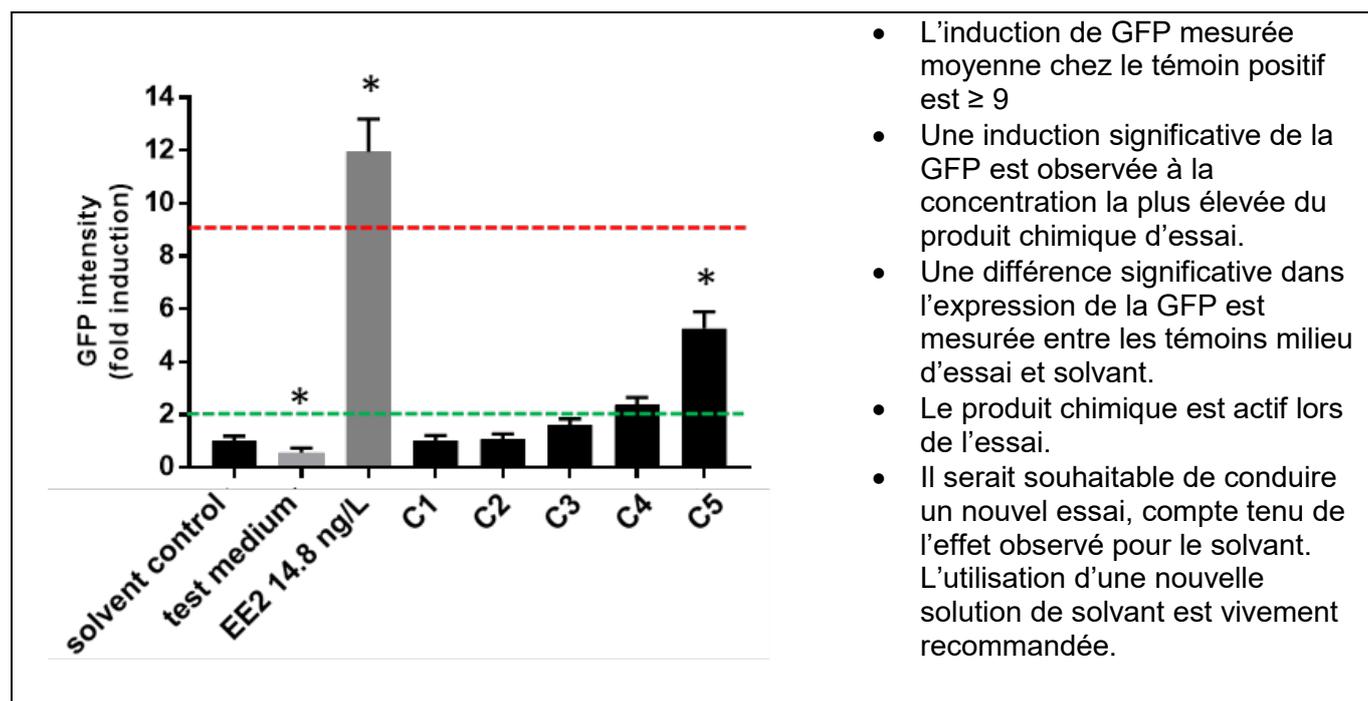


(c)



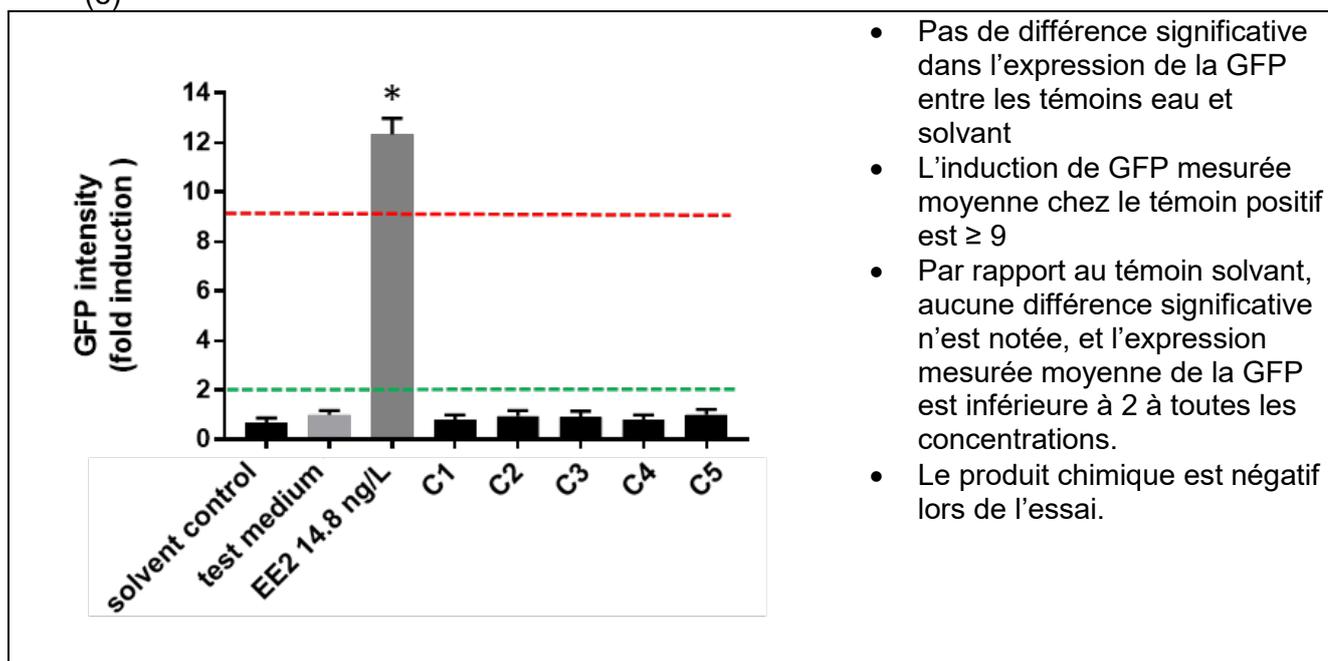
- Pas de différence significative dans l'expression de la GFP entre les témoins milieu d'essai et solvant
- L'induction de GFP moyenne mesurée chez le témoin positif est ≥ 9
- Une différence significative est mesurée pour toutes les concentrations d'essai et l'expression mesurée moyenne de la GFP est > 2 .
- Le produit chimique d'essai est identifié comme actif.

(d)



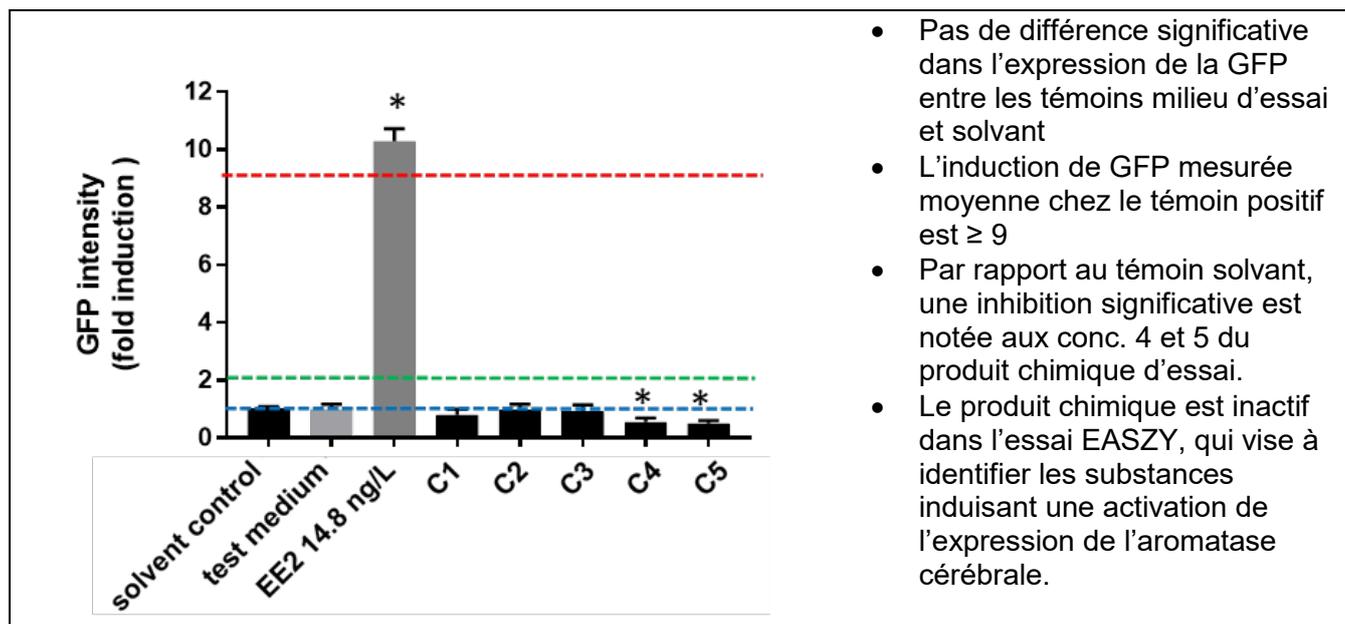
- L'induction de GFP mesurée moyenne chez le témoin positif est ≥ 9
- Une induction significative de la GFP est observée à la concentration la plus élevée du produit chimique d'essai.
- Une différence significative dans l'expression de la GFP est mesurée entre les témoins milieu d'essai et solvant.
- Le produit chimique est actif lors de l'essai.
- Il serait souhaitable de conduire un nouvel essai, compte tenu de l'effet observé pour le solvant. L'utilisation d'une nouvelle solution de solvant est vivement recommandée.

(e)



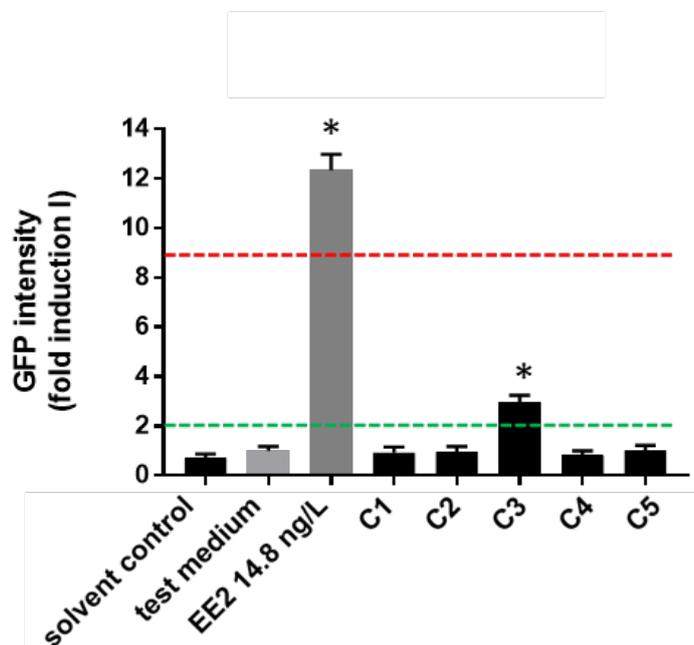
- Pas de différence significative dans l'expression de la GFP entre les témoins eau et solvant
- L'induction de GFP mesurée moyenne chez le témoin positif est ≥ 9
- Par rapport au témoin solvant, aucune différence significative n'est notée, et l'expression mesurée moyenne de la GFP est inférieure à 2 à toutes les concentrations.
- Le produit chimique est négatif lors de l'essai.

(f)



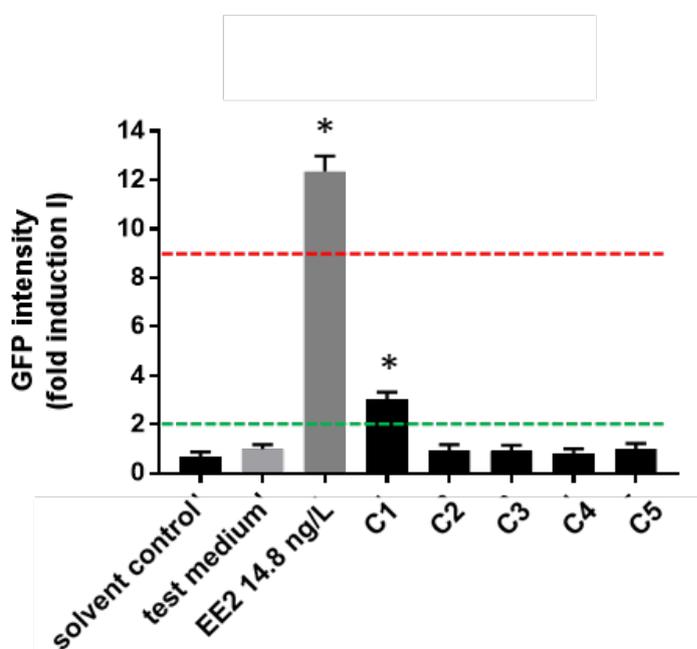
- Pas de différence significative dans l'expression de la GFP entre les témoins milieu d'essai et solvant
- L'induction de GFP mesurée moyenne chez le témoin positif est ≥ 9
- Par rapport au témoin solvant, une inhibition significative est notée aux conc. 4 et 5 du produit chimique d'essai.
- Le produit chimique est inactif dans l'essai EASZY, qui vise à identifier les substances induisant une activation de l'expression de l'aromatase cérébrale.

(g)



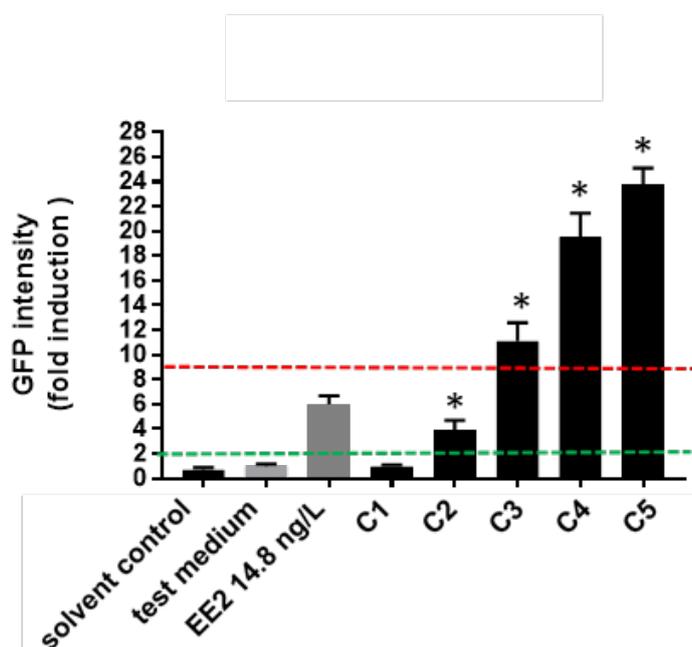
- Pas de différence significative dans l'expression de la GFP entre les témoins milieu d'essai et solvant
- L'induction de GFP mesurée moyenne chez le témoin positif est ≥ 9
- Une différence significative est mesurée à une concentration intermédiaire (conc. 3) et l'induction de GFP moyenne mesurée est > 2
- Aucune conclusion formelle ne peut être tirée
- Compte tenu de la courbe concentration-réponse atypique, l'essai doit être répété
- Les taux d'éclosion et/ou de mortalité aux deux concentrations les plus élevées devront être examinés avec soin, car ils peuvent expliquer une moindre induction de GFP à ces deux concentrations

(h)



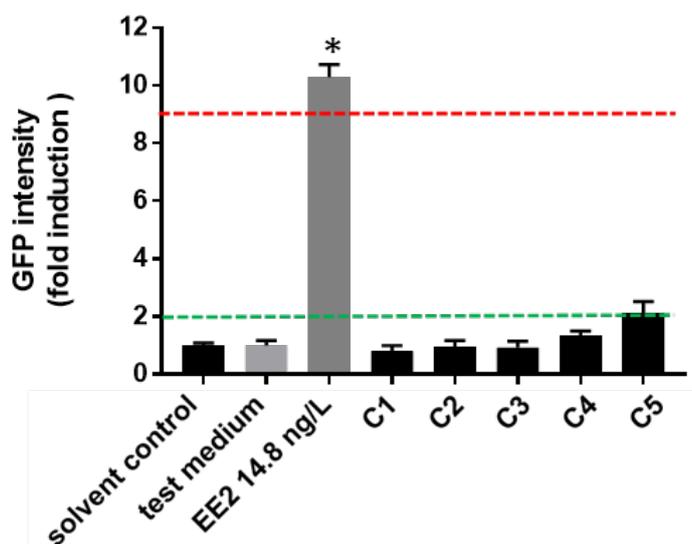
- Pas de différence significative dans l'expression de la GFP entre les témoins milieu d'essai et solvant
- L'induction de GFP mesurée moyenne chez le témoin positif est ≥ 9
- Une différence significative est mesurée à la concentration la plus basse, avec une induction de GFP moyenne mesurée > 2
- La courbe concentration-réponse étant atypique, il serait souhaitable de répéter l'essai avec une nouvelle gamme de concentrations incluant des concentrations inférieures à la conc. 1

(i)



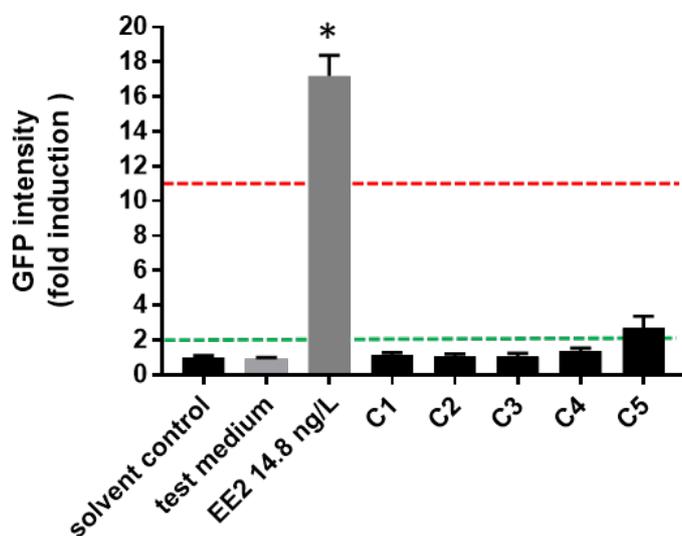
- Pas de différence significative dans l'expression de la GFP entre les témoins milieu d'essai et solvant
- Le produit chimique d'essai provoque une induction de GFP dépendante de la concentration, avec une induction moyenne mesurée > 2 fois
- Toutefois, l'induction de GFP mesurée moyenne chez le témoin positif est < 9
- Le critère de validité pour le témoin positif n'étant pas rempli, l'essai doit être répété
- Dans ce cas, le produit chimique d'essai est fortement suspecté d'être actif, mais il faut disposer des résultats d'un essai valide

(j)



- Pas de différence significative dans l'expression de la GFP entre les témoins milieu d'essai et solvant
- L'induction de GFP mesurée moyenne chez le témoin positif est ≥ 9
- Le produit chimique d'essai provoque une induction de GFP significative à la concentration d'essai la plus élevée
- Toutefois, l'induction de GFP moyenne mesurée à la conc. 5 est ≤ 2
- Il est recommandé de réaliser un autre essai en testant une/des concentration(s) supérieure(s) à C5, en tenant compte de la limite de solubilité et de la CMT
- Si le second essai donne des résultats similaires, le produit chimique d'essai ne peut pas être identifié comme actif dans l'essai EASZY
- D'autres essais pertinents peuvent être réalisés

(k)



- Pas de différence significative dans l'expression de la GFP entre les témoins milieu d'essai et solvant
- L'induction de GFP mesurée moyenne chez le témoin positif est ≥ 9
- L'induction de GFP mesurée moyenne à la concentration la plus élevée du produit chimique d'essai est > 2
- Toutefois, l'induction n'est pas significative par rapport au groupe solvant
- Il convient de répéter l'essai
- Si les résultats sont similaires, il ne sera pas possible de tirer de conclusion formelle des seuls essais EASZY