



**Section 2**  
**Effets sur les systèmes biologiques**

**Essai n° 240:**  
Étude étendue de toxicité pour la  
reproduction sur une génération chez  
médaka (MEOGRT)

4 juillet 2023

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



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

## Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez médaka (MEOGRT)

### INTRODUCTION

1. L'étude de reproduction étendue sur une génération chez médaka (*Medaka Extended One Generation Reproduction Test*, MEOGRT) est un essai complet d'exposition sur plusieurs générations chez le poisson visant à obtenir des données pouvant servir à l'évaluation des dangers et des risques pour l'environnement liés aux produits chimiques, en particulier les produits suspectés d'être des perturbateurs endocriniens (PE). L'exposition dans le test MEOGRT débute dès la reproduction active de poissons adultes de la génération parentale F0, suivie de la vie entière de la première génération F1, et est poursuivie jusqu'à l'éclosion (jusqu'à deux semaines post-fécondation, spf) dans la seconde génération (F2). Des investigations complémentaires seraient nécessaires pour justifier une extension éventuelle au-delà de l'éclosion à la génération F2 ; actuellement, les données disponibles ne fournissent pas d'éléments ou de critères justifiant une extension de la génération F2. Cependant, cette Ligne directrice pourra être mise à jour en fonction d'éventuelles informations ou données nouvelles. Il pourra ainsi être conseillé, dans certaines circonstances, d'étendre la génération F2 jusqu'à la reproduction (dans le cas de produits chimiques présentant un pouvoir élevé de bioconcentration, ou d'indications relatives à des effets transgénérationnels dans d'autres taxons). Cet essai peut être utilisé pour l'évaluation des effets chroniques potentiels des produits chimiques, notamment ceux susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien, chez le poisson. La méthode décrite vise principalement à mettre en évidence des effets potentiels pertinents au niveau d'une population (à savoir des impacts indésirables sur la survie, le développement, la croissance et la reproduction) afin de calculer une concentration sans effet observé (CSEO) ou une concentration efficace à x % (CE<sub>x</sub>) ; il convient cependant de noter que les approches de type CE<sub>x</sub> sont rarement adaptées aux études de grande ampleur de ce type, où l'augmentation du nombre de concentrations d'essai en vue de déterminer la CE<sub>x</sub> souhaitée peut être impraticable et peut aussi poser des problèmes en termes de bien-être animal, compte tenu du grand nombre d'animaux utilisés. Pour les produits chimiques ne nécessitant pas une évaluation multigénérationnelle ou ne constituant pas des perturbateurs endocriniens potentiels, d'autres essais peuvent être plus adaptés (1). Le médaka japonais est l'espèce à utiliser dans cet essai en raison de la brièveté de son cycle de vie et de la possibilité de déterminer son sexe génétique (2), ce qui est une caractéristique clé de cette Ligne directrice. Les méthodes effets observés spécifiques décrits dans la présente Ligne directrice s'appliquent exclusivement au médaka japonais. D'autres espèces de petits poissons (le poisson-zèbre, par exemple) peuvent être adaptées à un protocole d'essai similaire.

2. Plusieurs effets biologiques sont mesurés dans la présente Ligne directrice. Il s'agit en premier lieu de mettre en évidence les effets indésirables potentiels sur des paramètres pertinents en termes de

population, tels que la survie, le développement macroscopique, la croissance et la reproduction. En second lieu, afin de disposer d'informations mécanistiques et de pouvoir établir des liens entre les résultats d'autres types d'études de terrain ou de laboratoire établissant *a posteriori* une activité potentielle de perturbation du système endocrinien (activité androgénique ou œstrogénique dans d'autres tests et essais, par exemple), on obtient d'autres informations utiles en mesurant l'ARNm de la *vitellogénine (vtg)* (ou la protéine vitellogénine, VTG) et des caractères sexuels secondaires (CSS) phénotypiques liés au sexe génétique, et en procédant à une évaluation histopathologique. Il convient de noter que si un produit chimique testé ou ses métabolites ne sont pas suspectés d'être des PE, il est possible de se dispenser de mesurer ces effets secondaires, des études nécessitant moins de ressources et d'animaux étant alors plus appropriées (1). Les définitions utilisées dans cette Ligne directrice sont données à l'[annexe 1](#).

3. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont examinées de façon périodiques afin de prendre en compte les progrès techniques, les évolutions des besoins réglementaires, et les considérations de bien-être animal. La révision de cette Ligne directrice, initialement adoptée en 2015, n'inclut pas de changement de la conception de l'essai mais vise à clarifier la Ligne directrice, notamment concernant :

- Clarification de certains aspects du protocole et des effets mesurés à travers la Ligne directrice.
- Une méthode supplémentaire d'échantillonnage de l'ADN par écouvillonnage du mucus de la peau.
- Ajoût d'annexes « guide de préparation des coupes tissulaires pour la détermination du sexe et le classement par stade des gonades remarques préliminaires et limites » (Annexe 8 tirée de la LD 234) et « procédures recommandées pour les prélèvements effectués à des fins de dosage de la vitellogénine » ([annexe 9](#) tirée de la LD 229) ;
- Une mise à jour de la section sur l'analyse statistique (maintenant [annexe 12](#))
- Information sur les souches utilisées dans cette Ligne directrice ([annexe 13](#)).

4. Étant donné le nombre limité de produits chimiques testés et le nombre limité de laboratoires impliqués dans l'étude de validation de cette méthode d'essai complexe, on peut s'attendre à ce que la Ligne directrice soit réexaminée et si nécessaire mise à jour à la lumière de l'expérience acquise. Ces données peuvent être utilisées au niveau 5 du Cadre conceptuel de l'OCDE (3). La méthode d'essai commence par l'exposition de poissons adultes (génération F0) au produit chimique testé durant la phase de reproduction. L'exposition se poursuit durant les phases de développement et de reproduction à la génération F1 et la phase d'éclosion à la génération F2 ; l'essai permet donc d'évaluer les voies endocriniennes tant structurelles qu'activationnelles. Une approche fondée sur l'analyse du poids de la preuve peut être mise en œuvre dans l'interprétation des effets mesurés au niveau endocrinien.

5. Cet essai doit porter sur un nombre d'individus permettant de garantir une puissance suffisante à l'évaluation des effets relatifs à la reproduction (voir [annexe 3](#)), ce nombre ne dépassant pas toutefois le minimum requis eu égard au bien-être animal. Compte tenu du grand nombre d'animaux utilisés, il importe de considérer avec attention la nécessité de l'essai, en fonction des données existantes qui pourraient déjà comporter des informations pertinentes sur bon nombre des effets mesurés dans le test MEOGRT. Le document de l'OCDE *Fish Toxicity Testing Framework* (Série sur les essais et évaluations, n° 171) peut apporter une aide à cet égard (1).

6. L'essai a été conçu pour permettre la mise en évidence des effets d'un seul produit chimique (une substance active, par exemple). Cependant, si un essai doit être réalisé sur un mélange, il convient de vérifier si les résultats seront acceptables dans le cadre réglementaire imposé.

7. Avant d'initier le test, il est important de posséder des informations sur les propriétés physico-chimiques du produit chimique testé, afin notamment de s'assurer de la stabilité des solutions de produit

chimique testé. Il est aussi nécessaire de maîtriser une méthode analytique suffisamment sensible permettant de vérifier les concentrations de produit chimique testé.

## PRINCIPE DE L'ESSAI

8. L'essai commence par l'exposition de mâles et de femelles sexuellement matures (au minimum 12 spf) par couples reproducteurs pendant 3 semaines, au cours desquelles le produit chimique est distribué dans l'organisme de la génération parentale (F0) selon le comportement toxicocinétique du produit. Le plus près possible du premier jour de la quatrième semaine, les œufs sont récoltés en vue d'obtenir la génération F1. Au cours de l'élevage de la génération F1 (15 semaines au total), le taux d'éclosion et la survie sont évalués. De plus, des poissons sont prélevés à 9-10 spf pour la mesure des effets sur le développement, et la ponte est évaluée sur trois semaines, de 12 à 14 spf. Une génération F2 est obtenue après la troisième semaine d'évaluation de la reproduction, et élevée jusqu'à la fin de l'éclosion.

## CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

9. Les critères de validité de l'essai sont les suivants :

- La concentration d'oxygène dissous est  $\geq 60$  % de la valeur de saturation en air pendant tout l'essai ;
- La température moyenne de l'eau pendant toute la durée de l'étude est comprise entre 24 et 26 °C. De brefs écarts par rapport à la moyenne dans certains aquariums n'excèdent pas 2 °C ;
- La fécondité moyenne des témoins dans chaque génération (F0 et F1) est supérieure à 20 œufs par couple et par jour. De plus, 16 des 24 couples reproducteurs témoins recommandés (soit plus de 65 % d'entre eux) produisent plus de 20 œufs par couple et par jour. La fertilité (taux de fertilisation) de tous les œufs produits pendant l'évaluation doit être supérieure à 80% dans les témoins de la F0 et de la F1 ;
- Le taux d'éclosion des œufs est  $\geq 80$  % (en moyenne) chez les témoins (dans chacune des générations F1 et F2) ;
- La survie dans les témoins doit être supérieure à 80% (en moyenne) à partir de l'éclosion jusqu'à 3 spf pour toutes les générations (F1 et F2), et doit être supérieure à 90% (en moyenne) à partir de 3 spf jusqu'à l'euthanasie pour la génération F1 (soit 15 spf);
- Les données disponibles démontrent que la concentration du produit chimique testé en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de  $\pm 20$  % autour des valeurs moyennes mesurées.

En ce qui concerne la température de l'eau, bien que cela ne soit pas un critère de validité, les réplicats au sein d'un traitement ne doivent pas être statistiquement différents les uns des autres, et les groupes traités au sein d'un essai ne doivent pas être statistiquement différents les uns des autres (sur la base des températures mesurées quotidiennement, et en excluant les écarts de courte durée).

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

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

### **Appareillage**

11. On utilise du matériel courant de laboratoire et en particulier :
- (a) oxygénomètre et pH-mètre ;
  - (b) instrument permettant de mesurer la dureté et l'alcalinité de l'eau ;
  - (c) dispositif adéquat de régulation de la température avec, de préférence, une surveillance en continu ;
  - (d) cuves en matériau chimiquement inerte et de capacité adaptée à la charge et à la densité de peuplement recommandées (voir [annexe 3](#)) ;
  - (e) balance suffisamment précise (précision de  $\pm 0.5$  mg).

### **Eau**

12. On utilise une eau dans laquelle l'espèce soumise à l'essai présente des taux adéquats de croissance et de survie à long terme. Cette eau doit être de qualité constante pendant la durée de l'essai. Pour s'assurer que l'eau de dilution ne puisse pas influencer sur le résultat de l'essai (par complexation du produit chimique testé, par exemple) ou avoir des effets néfastes sur la performance des poissons géniteurs, on prélèvera des échantillons à différents intervalles pour analyse. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), des principaux anions et cations (Ca, Mg, Na, K, Cl, SO<sub>4</sub>, par exemple), des pesticides, du carbone organique total et des solides en suspension doit être effectué tous les six mois, par exemple, pour une eau de dilution connue pour être de qualité relativement constante. Certaines caractéristiques chimiques pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'[annexe 2](#). Le pH de l'eau doit se situer entre 6.5 et 8.5 et ne pas varier de au-delà de 0.5 unité au cours de l'essai.

### **Système d'exposition**

13. La conception et les matériels utilisés pour le système d'exposition ne sont pas spécifiés. On utilisera pour la construction du système d'exposition du verre, de l'acier inoxydable ou d'autres matériaux chimiquement inertes qui n'auront pas été contaminés par de précédents essais. Pour cet essai, un système dynamique est fortement recommandé (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11)(12) (13).

### **Solutions d'essai**

14. Une solution mère du produit chimique testé est introduite dans le système d'exposition à l'aide d'une pompe appropriée. Le débit de la solution mère doit être calibré d'après les données analytiques relatives aux solutions d'essai établies avant le début de l'exposition, et faire l'objet d'un contrôle volumétrique périodique au cours de l'essai. La solution d'essai est renouvelée dans chaque enceinte selon les besoins (minimum de 5 renouvellements en volume/jour, par exemple, et jusqu'à 16 renouvellements en volume/jour, soit un débit pouvant aller jusqu'à 20 mL/min), selon la stabilité du produit chimique testé et la qualité de l'eau.

15. Des solutions d'essai sont ajustées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. La solution mère est, de préférence, préparée par simple mélange ou agitation du produit chimique testé dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitation et/ou ultrasons, par exemple). Des colonnes/systèmes de saturation ou des méthodes de dosage passif (14) peuvent être utilisés pour

l'obtention d'une solution mère à la concentration voulue. On s'efforcera dans toute la mesure du possible d'éviter l'emploi de solvants et autres véhicules car : (1) certains solvants peuvent avoir eux-mêmes des effets toxiques et/ou induire des réponses indésirables ou inattendues, (2) l'essai de produits chimiques à une concentration supérieure à leur solubilité dans l'eau (ce qui arrive fréquemment si des solvants sont utilisés) peut fausser la détermination des concentrations efficaces, (3) le recours aux solvants dans les essais à long terme peut se traduire par la formation importante de biofilms associés à une activité microbienne, ce qui peut avoir un impact sur les conditions environnementales et sur la capacité de maintenir les concentrations d'exposition, et (4) en l'absence de données historiques démontrant que le solvant n'influe pas sur les résultats de l'étude, l'usage de solvants nécessite le traitement d'un groupe témoin avec solvant, ce qui a des effets significatifs en termes de bien-être animal, des animaux supplémentaires étant alors nécessaires pour la conduite de l'essai. Pour les produits chimiques difficiles à tester, un solvant peut être employé en dernier ressort, et l'on consultera alors le Document d'orientation de l'OCDE n° 23 sur les essais de toxicité aquatique des substances et mélanges « difficiles » (15) afin de déterminer la meilleure méthode à employer. Le solvant sera choisi en fonction des propriétés chimiques du produit chimique testé et de la disponibilité de données historiques sur l'utilisation du solvant. En cas de recours à un solvant comme véhicule, des témoins appropriés pour le solvant seront analysés en plus des témoins (négatifs) sans solvant (eau de dilution seule). Si le recours à un solvant est inévitable et si une activité microbienne (formation de biofilms) se produit, il est recommandé de noter/consigner dans le rapport la présence de biofilm dans chaque cuve (au moins une fois par semaine) pendant toute la durée de l'essai. Idéalement, la concentration de solvant devra être maintenue constante dans le témoin avec solvant et tous les groupes traités. Si la concentration de solvant n'est pas maintenue constante, c'est la concentration de solvant la plus forte dans le traitement d'essai qui sera utilisée chez le témoin avec solvant. Si un solvant est utilisé comme véhicule, les concentrations maximales de solvant ne devront pas dépasser 100 µL/L ou 100 mg/L (15), et il est recommandé de maintenir la concentration de solvant aussi basse que possible (< 20 µL/L, par exemple), pour éviter que le solvant puisse avoir une incidence sur les effets mesurés (16).

### **Animaux d'essai**

#### *Sélection et stabulation des poissons*

16. L'espèce soumise aux essais est le médaka japonais *Oryzias latipes*, en raison de la brièveté de son cycle de vie et de la possibilité de déterminer son sexe génétique. Bien que d'autres espèces de petits poissons puissent convenir pour un protocole d'essai similaire, les méthodes et observations spécifiques décrites dans cette ligne directrice s'appliquent exclusivement au médaka japonais (voir le paragraphe 1). Le médaka se prête bien à la reproduction en captivité ; des méthodes ont été publiées pour sa culture (17) (18) (19), et l'on dispose de données d'essais sur la létalité à court terme, les premiers stades de la vie et le cycle de vie complet (5) (6) (8) (9) (20). Tous les poissons sont soumis à une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité. Ils sont nourris avec des artémies vivantes, *Artemia* spp., nauplii qui peuvent être complétés par de la nourriture en flocons du commerce, si nécessaire. Des analyses pratiquées régulièrement sur les aliments en flocons doivent permettre de s'assurer qu'ils ne sont pas contaminés.

17. Dans la mesure où des méthodes d'élevage appropriées sont suivies, il n'est pas nécessaire d'appliquer un protocole de culture spécifique. Le médaka peut par exemple être élevé en cuves de 2 L avec 240 larves par cuve jusqu'à 4 spf, puis en cuves de 2 L avec 10 poissons par cuve jusqu'à 8 spf, après quoi les couples reproducteurs sont transférés dans des cuves de 2 L.

*Acclimatation et sélection des poissons*

18. Les poissons d'essai sont sélectionnés parmi une population de laboratoire issue d'une même lignée, qui aura été acclimatée pendant au moins deux semaines avant l'essai dans des conditions de qualité de l'eau et d'éclairage semblables à celles de l'essai (nota : cette période d'acclimatation n'est pas une période de pré-exposition *in situ*). Il est recommandé que les poissons d'essai soient obtenus par culture en interne, le transport des poissons adultes étant stressant et pouvant interférer avec une ponte fiable. Les poissons doivent être nourris de nauplii d'artémies deux fois par jour pendant toute la période d'élevage et la phase d'exposition, complétés si nécessaire par des aliments en flocons du commerce. Un minimum de 42 couples reproducteurs (54 couples si un témoin avec solvant est requis en raison, notamment, de l'absence de données historiques à l'appui de l'utilisation du seul témoin avec solvant) sont considérés comme nécessaires pour démarrer cet essai de façon à garantir la réplication adéquate. En outre, il convient de vérifier pour chaque couple reproducteur de la génération F0 qu'il s'agit bien d'un couple XX-XY (présentant pour chaque sexe la configuration normale de chromosomes sexuels), afin d'éviter l'inclusion possible de mâles spontanés XX (voir le paragraphe 42 et l'[annexe 4](#) « mâles XX »).

19. Durant la phase d'acclimatation, la mortalité chez les poissons de culture doit être consignée, et les critères suivants s'appliquent après une période d'adaptation de 48 h :

- Mortalité supérieure à 10 % de la population en culture dans les sept jours précédant le transfert vers le système d'essai : rejet du lot complet ;
- Mortalité comprise entre 5 % et 10 % de la population dans les sept jours précédant le transfert vers le système d'essai : acclimatation pendant sept jours en plus de la période d'acclimatation de 2 semaines ; si la mortalité est supérieure à 5 % durant la seconde période de sept jours, rejet du lot complet ;
- Mortalité inférieure à 5 % de la population dans les sept jours précédant le transfert vers le système d'essai : acceptation du lot.

20. Les poissons ne doivent pas recevoir de traitement contre une maladie durant la période d'acclimatation de deux semaines précédant l'essai et durant la période d'exposition, et tout traitement doit être complètement évité si possible. Les poissons présentant des signes cliniques de maladies ne doivent pas être utilisés dans l'étude. Un relevé d'observations et de tout traitement prophylactique ou thérapeutique pendant la période de culture précédant l'essai doit être assuré.

21. La phase d'exposition débute avec des adultes sexuellement dimorphiques, génétiquement sexués, issus d'une population de laboratoire d'animaux sexuellement matures élevés à  $25 \pm 2$  °C. Les poissons doivent être identifiés comme des reproducteurs avérés (ayant produit une descendance viable) dans la semaine précédant l'exposition. Pour tout le groupe de poissons utilisés lors de l'essai, la plage des poids individuels par sexe au début de l'essai ne doit pas sortir d'un intervalle de  $\pm 20$  % autour de la moyenne arithmétique des poids pour le même sexe. Un sous-échantillon de poissons sera pesé avant l'essai afin d'estimer le poids moyen. Les poissons sélectionnés doivent être au moins à 12 spf, et avoir un poids  $\geq 300$  mg pour les femelles et  $\geq 250$  mg pour les mâles.

## CONCEPTION DE L'ESSAI

### **Concentrations d'essai**

22. Il est recommandé d'utiliser cinq concentrations d'essai, en plus du/des témoin(s). Toutes les sources d'information doivent être prises en compte lors du choix de la gamme de concentrations d'essai, y compris les relations quantitatives structure-activité (QSAR), les données établies par la méthode des références croisées, les résultats d'essais sur les poissons tels que les essais de mortalité aiguë (OCDE 203) (21), l'essai de reproduction à court terme chez les poissons (LD 229 de l'OCDE) (22) et d'autres Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, comme les LD n° 210, 212, 230, 234 ou 236 (23) (24) (25) (26) (27) si ces données sont disponibles ou, si nécessaire, les résultats d'un essai visant à déterminer la gamme des concentrations et couvrant éventuellement une phase de reproduction. Si un essai de détermination de la gamme des concentrations est nécessaire, il peut être conduit dans des conditions (qualité de l'eau, système d'essai, charge animale) similaires à celles de l'essai définitif. Si l'usage d'un solvant est nécessaire et qu'aucune donnée historique n'est disponible, l'essai de détermination de la gamme de concentrations peut être utilisé pour s'assurer de l'adéquation du solvant. La concentration d'essai la plus élevée ne doit pas dépasser la solubilité dans l'eau, 10 mg/L ou 1/10<sup>e</sup> de la CL50 à 96 h (28). La concentration la plus basse doit être de 10 à 100 fois plus faible que la concentration la plus élevée. L'utilisation de cinq concentrations dans cet essai permet non seulement de mesurer les relations dose-réponse, mais fournit en outre la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la CSEO requises pour l'évaluation des risques dans certains programmes à visée réglementaire ou contextes juridiques. En règle générale, le facteur d'espacement des concentrations nominales de produit chimique testé entre niveaux de traitement adjacents est  $\leq 3.2$ .

23. Bien qu'une baisse de la reproduction puisse être observée dans les groupes exposés aux concentrations les plus élevées, la reproduction devrait être suffisante, au moins dans le troisième groupe le plus exposé et tous les groupes les moins exposés de la génération F0, pour remplir les incubateurs éclosiers. De plus, la survie embryonnaire dans le troisième groupe le plus exposé et les groupes les moins exposés de la génération F1 doit être de nature à permettre l'évaluation des effets mesurés lors du prélèvement subadulte (voir les paragraphes 37 et 39 et l'[annexe 11](#)). En outre, on doit observer au moins une survie post-éclosion minimale (~20 %) dans le second groupe le plus exposé de F1. Ces points ne sont pas des critères de validité, mais des recommandations visant à permettre le calcul des CSEO sur des bases solides.

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

24. Il convient d'utiliser un minimum de six enceintes réplicats par concentration d'essai (voir [annexe 7](#)). Pendant la phase de reproduction (de la génération F1), la structure de réplication est doublée pour l'évaluation de la fécondité et chaque réplicat comporte un seul couple reproducteur (voir paragraphe 43).

25. Outre la série de concentrations du produit chimique testé, on utilisera une enceinte témoin contenant de l'eau de dilution uniquement et, si nécessaire, une autre contenant uniquement le solvant dans l'eau. Le nombre d'enceintes réplicats doit être doublé pour les témoins, afin de garantir la puissance statistique requise (au moins douze réplicats devront être utilisés pour les témoins (29)). Durant la phase de reproduction de la génération F1, le nombre de réplicats est doublé chez les témoins (soit 24 réplicats au minimum, chaque réplicat ne comportant qu'un seul couple reproducteur). Après la reproduction, les réplicats témoins ne doivent pas contenir plus de 20 embryons (poissons).



## PROCÉDURE

### **Début de l'essai**

26. Les poissons adultes sexuellement actifs utilisés pour démarrer la génération F0 de l'essai sont sélectionnés sur deux critères : âge (le plus souvent plus de 12 spf mais de préférence pas plus de 16 spf) et poids (à savoir femelles  $\geq 300$  mg et mâles  $\geq 250$  mg).

27. Les couples mâle-femelle répondant aux spécifications ci-dessus sont placés par couples individuels dans les cuves destinées à recevoir les réplicats, soit douze réplicats chez les témoins et six réplicats dans les groupes traités par le produit chimique au début de l'essai. Ces cuves sont assignées de façon aléatoire à un traitement (par exemple T1-T5 et témoin) et un réplicat (par exemple A-L témoins et A-F traités), puis placées dans le système d'exposition avec le débit approprié pour chaque cuve.

### **Conditions d'exposition**

28. On trouvera à l'[annexe 3](#) un récapitulatif complet des paramètres et conditions d'essai. Le respect de ces spécifications devrait se traduire chez les témoins par des valeurs mesurées similaires à celles indiquées à l'[annexe 4](#).

29. Au cours de l'essai, l'oxygène dissous, le pH et la température doivent être mesurés dans au moins un récipient d'essai pour chaque groupe traité et le groupe témoin. Ces mesures, à l'exception des mesures de température, doivent être réalisées au moins une fois par semaine pendant la période d'exposition. La température moyenne de l'eau pendant toute la durée de l'étude doit se situer entre 24 et 26 °C. La température doit être mesurée chaque jour pendant la période d'exposition. Le pH de l'eau doit se situer entre 6.5 et 8.5 et ne pas varier de au-delà de 0.5 unité au cours de l'essai. Les réplicats au sein d'un traitement ne doivent pas différer statistiquement les uns des autres, et les groupes traités au sein de l'essai ne doivent pas différer statistiquement les uns des autres (sur la base des mesures quotidiennes de température, et en excluant de brefs écarts).

### **Durée d'exposition**

30. L'essai expose des poissons sexuellement aptes à la reproduction en commençant par la génération F0, exposée pendant trois semaines. A la semaine 4, approximativement au 24<sup>e</sup> jour d'essai, la génération F1 est mise en place, les couples reproducteurs F0 sont euthanasiés et leur poids et leur longueur sont consignés (voir paragraphe 36). La génération F1 est ensuite exposée pendant plus de 14 semaines (15 semaines au total pour F1) et la génération F2 est exposée pendant deux semaines jusqu'à l'éclosion. La durée totale de l'essai est en principe de 19 semaines (jusqu'à l'éclosion de F2). Le déroulement chronologique de l'essai est représenté au tableau 2 et expliqué en détail à l'[annexe 9](#).

### **Régime alimentaire**

31. Les poissons peuvent être nourris *ad libitum* d'artémies (*Artemia* spp., nauplii âgés de 24 heures), complétées si nécessaire par des aliments en flocons du commerce. Il convient d'analyser régulièrement les aliments en flocons pour s'assurer qu'ils ne sont pas contaminés par des pesticides organochlorés, des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou des polychlorobiphényles (PCB). Les aliments présentant un niveau élevé de substances agissant sur le système endocrinien (c'est-à-dire de phyto-

œstrogènes) qui pourraient compromettre la réponse à l'essai sont à éviter. Les aliments non consommés et les matières fécales doivent être retirés des récipients d'essai par des méthodes appropriées, par exemple par un nettoyage soigneux du fond de chaque cuve au moyen d'un siphon. Les côtés et le fond de chaque cuve doivent également être nettoyés une ou deux fois par semaine (par grattage avec une spatule, par exemple). On trouvera à l'[annexe 5](#) un exemple de régime alimentaire. Les doses distribuées sont fonction du nombre de poissons par réplicat. Elles sont donc réduites en cas de mortalité dans un réplicat.

### ***Dosages analytiques et mesures***

32. Avant le début de la période d'exposition, il convient de vérifier le bon fonctionnement du système de distribution du produit chimique. Toutes les méthodes analytiques nécessaires doivent être établies, et il faut disposer d'une connaissance suffisante de la stabilité du produit chimique dans le système d'essai. Durant l'essai, les concentrations de produit chimique testé sont déterminées à des intervalles appropriés, de préférence une fois par semaine sur un réplicat pour chaque groupe traité, en changeant chaque semaine de réplicat dans un même groupe. Les concentrations d'essai et les témoins doivent être soumis à une vérification analytique. S'il y a une indication que la solubilité est limitée (par exemple un trouble, une précipitation, une pellicule), il est recommandé de centrifuger les échantillons d'eau et/ou de filtrer avant la vérification analytique.

33. Au cours de l'essai, les débits de diluant et de solution mère doivent être vérifiés à intervalles réguliers (au minimum trois fois par semaine, par exemple). Il est recommandé de fonder les résultats sur les concentrations mesurées. Cependant, si la concentration du produit chimique testé en solution a été correctement maintenue tout au long de l'essai dans un intervalle de  $\pm 20\%$  autour des valeurs moyennes mesurées, les résultats pourront être calculés à partir des valeurs nominales ou mesurées. Dans le cas de produits chimiques présentant une accumulation marquée chez le poisson, les concentrations d'essai pourront décroître au fur et à mesure de la croissance des poissons. En pareil cas, il est recommandé d'accroître le taux de renouvellement de la solution d'essai dans chaque cuve afin que les concentrations d'essai restent aussi constantes que possible.

### ***Observations et effets mesurés***

34. Les effets mesurés sont la fécondité, la fertilité, l'éclosion, la croissance et la survie, l'objectif étant d'évaluer les effets possibles au niveau de la population. Des observations du comportement doivent également être réalisées chaque jour, et tout comportement inhabituel doit être consigné. Les autres effets mesurés, d'ordre mécanistique, sont les niveaux hépatiques d'ARN messager de la vitellogénine (ARNm *vtg*) ou de protéine VTG établis par immuno-essai ((28), par exemple), les marqueurs sexuels phénotypiques tels que les papilles de la nageoire anale caractéristiques du mâle, l'évaluation histologique du sexe gonadique et l'évaluation histopathologique des reins, du foie et des gonades (voir la liste des effets mesurés au tableau 1). Tous ces effets spécifiques sont évalués dans le contexte de la détermination du sexe génétique de l'individu, basée sur la présence ou l'absence du gène *dmy* déterminant le sexe masculin chez médaka (voir le paragraphe 42). En outre, dans le temps précédent la sélection du couple de reproduction dans la phase subadulte, chaque réplicat doit être suivi pour sa première ponte. Le jour de l'étude où celle-ci a lieu doit être consigné, mais l'analyse statistique n'est pas requise. Une fois que les couples de reproduction sont établis, chaque récipient d'essai est évalué chaque matin pour la présence d'œufs. Quand le couple de reproduction produit les premiers œufs, le temps jusqu'à cette première ponte est consigné (par exemple si le couple de reproducteurs produit un œuf le matin suivant leur placement dans le récipient d'essai, il est reporté 1 jour). En outre, un sex-ratio phénotypique simple peut être établi sur la base des informations fournies par le comptage des papilles de la nageoire anale, permettant de définir les individus comme mâle ou femelle du point de vue phénotypique. Cette LD ne

saurait détecter des déviations modérées par rapport au sex-ratio attendu, car le nombre relativement faible de poissons par réplicat n'apporte pas une puissance statistique suffisante. Aussi, lors de l'évaluation histopathologique, les gonades sont évaluées et des analyses beaucoup plus puissantes sont réalisées pour la détermination du phénotype gonadique dans le contexte du sexe génétique.

35. L'objectif premier de cette LD est d'évaluer les effets potentiels au niveau d'une population d'un produit chimique testé. Les effets mécanistiques mesurés (VTG, CSS et certains effets histopathologiques touchant les gonades) peuvent également aider à déterminer s'il existe un effet médié par une activité endocrinienne. Cependant, ces effets d'ordre mécanistique peuvent aussi être influencés par une toxicité systémique ou autre. On pourra donc aussi évaluer plus précisément l'histopathologie hépatique et rénale dans le but de mieux comprendre les éventuelles réponses au niveau des effets mécanistiques mesurés. Toutefois, si ces évaluations précises ne sont pas réalisées, les anomalies macroscopiques observées incidemment lors de l'évaluation histopathologique devront néanmoins être relevées et consignées dans le rapport.

### ***Euthanasie des poissons***

36. A la fin de l'exposition des générations F0 et F1, lorsqu'un sous-échantillon de poissons subadultes est prélevé, les poissons sont euthanasiés à l'aide de quantités appropriées de solution anesthésique (par exemple tricaine méthanesulfonate, MS-222 (CAS.886-86-2), 100-500 mg/L) tamponnés avec 300 mg/L de NaHCO<sub>3</sub> (bicarbonate de sodium, CAS.144-55-8)) destinées à réduire l'irritation de la membrane muqueuse. Si les poissons montrent des signes de souffrance considérable (i.e. sévères et que leur mort est prévisible) et que leur état est moribond, les animaux doivent être anesthésiés puis euthanasiés, et traités comme des cas de mortalité lors de l'analyse des données. Quand un poisson est euthanasié dans ce cas sévère, il faut le consigner dans le rapport d'essai. En fonction du moment de l'essai ou le poisson est euthanasié, il peut être retenu pour une analyse histopathologique, en fixant le spécimen préalablement à une analyse future.

### ***Manipulation des œufs et des larves***

#### *Récolte des œufs des couples reproducteurs en vue de la reproduction de la génération suivante*

37. Les œufs sont récoltés le premier jour (ou les deux premiers jours, si nécessaire) de la semaine d'essai 4 entre F0 et F1 et de la semaine d'essai 18 entre F1 et F2. La semaine d'essai 18 correspond à des poissons adultes F1 de 15 spf (semaines post-fécondation). Il importe que tous les œufs soient retirés de chaque cuve la veille de la récolte des œufs, afin que tous les œufs récoltés pour un couple reproducteur proviennent d'une seule et même ponte. Après la ponte, la femelle médaka transporte parfois ses œufs près de l'orifice anal en attendant de pouvoir les déposer sur un substrat. En l'absence de substrat dans la cuve, les œufs peuvent se trouver soit attachés à la femelle soit au fond de la cuve. Selon leur emplacement, ils seront prélevés avec précaution sur la femelle ou siphonnés depuis le fond de la cuve à la semaine d'essai 4 de F0 et la semaine d'essai 18 de F1. Tous les œufs récoltés au sein d'un traitement sont réunis avant d'être répartis dans les chambres d'incubation.

38. Les filaments qui maintiennent ensemble les œufs pondus doivent être retirés. Les œufs fécondés (jusqu'à 20 œufs) sont récoltés pour chaque couple reproducteur (1 couple par réplicat), regroupés par traitement et répartis de façon systématique dans les chambres d'incubation appropriées (annexes 6 et 7). Un bon microscope à dissection permet d'observer les marques du début de la fertilisation/du développement, telles que le gonflement de la membrane de fertilisation (chorion), la progression de la division cellulaire ou la formation de la blastula. Les chambres d'incubation peuvent être placées dans des « aquariums incubateurs » distincts pour chaque traitement (dans lesquels il faut alors mesurer les

paramètres de qualité de l'eau et les concentrations de produit chimique testé) ou dans l'aquarium de réplicats qui contiendra les larves écloses (éleuthéroembryons, par exemple). Si un deuxième jour de récolte est nécessaire (23<sup>e</sup> jour d'essai), tous les œufs des deux jours doivent être réunis et répartis systématiquement entre les réplicats de traitement.

#### *Élevage des œufs jusqu'à l'éclosion*

39. Les œufs fécondés sont agités continuellement, par exemple par des bulles d'air dans l'incubateur, ou par agitation verticale de l'incubateur. Les décès d'œufs fécondés (embryons) sont observés et consignés quotidiennement. Les œufs morts sont retirés des incubateurs ([annexe 11](#)). Au 7<sup>e</sup> jour post-fécondation (jpf), l'agitation est stoppée ou réduite de telle sorte que les œufs fécondés se déposent au fond de l'incubateur. Cela favorise l'éclosion, généralement le jour ou les deux jours suivants. Pour chaque traitement et témoin, on compte les alevins (jeunes larves ; éleuthéroembryons) (en regroupant les réplicats). Les œufs fécondés qui n'ont pas éclos au terme de deux fois le jour médian de l'éclosion chez les témoins (généralement à 16 ou 18 jpf) sont considérés comme non viables et écartés.

40. Douze alevins sont transférés dans chaque cuve de réplicat. Les alevins des chambres d'incubation sont réunis et répartis de façon systématique dans les cuves de réplicats ([annexe 7](#)). On peut à cet effet sélectionner de façon aléatoire un alevin du lot traité et ajouter séquentiellement un alevin par tirage en aveugle dans un aquarium pour réplicat. Chacune des cuves doit contenir un nombre égal (n=12) de larves écloses (au maximum 20 larves dans chaque cuve). S'il n'y a pas suffisamment d'alevins pour remplir tous les réplicats de traitements, il est recommandé de veiller à ce que le plus grand nombre de réplicats possible comportent 12 alevins. Les alevins peuvent être manipulés en toute sécurité au moyen de pipettes en verre de grand diamètre. Les alevins en surnombre sont euthanasiés au moyen d'un anesthésique. Durant les quelques semaines précédant la constitution des couples reproducteurs, le jour où est observée la première ponte doit être consigné pour chaque réplicat.

#### **Constitution des couples reproducteurs**

##### *Prélèvement tissulaire et détermination du sexe génotypique*

41. La détermination du sexe génotypique par prélèvement tissulaire au niveau d'une nageoire est réalisée à la spf 9-10 (c'est-à-dire la semaine d'essai 12-13 pour la génération F1). Tous les poissons d'une cuve sont anesthésiés (par des méthodes approuvées, IACUC, par exemple) et un petit échantillon de tissu est prélevé à l'extrémité dorsale ou ventrale de la nageoire caudale de chaque poisson, afin de déterminer le sexe génotypique de l'individu (26) (31). Une autre méthode d'échantillonnage de l'ADN telle que l'écouvillonnage du mucus de la peau (32) (33) (34) peut être utilisée, s'il est vérifié que cette méthode ne donne pas lieu à des infections bactériologiques ou n'affecte pas les autres effets mesurés. Les poissons d'un réplicat peuvent être placés dans de petites cages, si possible avec un poisson par cage, dans la cuve réplicat. Il est également possible de placer deux poissons par cage s'ils présentent des signes distinctifs. On peut à cet effet pratiquer des coupes différentes lors du prélèvement au niveau de la nageoire caudale (l'une à l'extrémité dorsale et l'autre à l'extrémité ventrale, par exemple).

42. Le sexe génotypique du médaka est déterminé par un gène identifié et séquencé (*dmy*) situé sur le chromosome Y. La présence de *dmy* indique un individu XY, quel que soit le phénotype, et l'absence de *dmy* indique un individu XX, quel que soit le phénotype (35) (36). De l'acide désoxyribonucléique (ADN) est extrait de chaque prélèvement et la présence ou l'absence de *dmy* est établie par réaction en chaîne par polymérase (PCR) (voir l'[annexe 8](#) de la LD234 ou les [appendices 4](#) et [5](#) dans USEPA TG 890.2200 (31)).

*Mise en place des couples reproducteurs*

43. Les informations sur le sexe génotypique sont utilisées pour établir des couples reproducteurs XX-XY, indépendamment du phénotype externe, qui peut être altéré par l'exposition à un produit chimique testé. Le lendemain de la détermination du sexe génotypique de chaque poisson, deux poissons XX et deux poissons XY de chaque réplicat sont sélectionnés de façon aléatoire et deux couples XX-XY sont mis en place. Si un réplicat ne comporte pas deux poissons XX ou deux XY, il convient de trouver des poissons appropriés dans d'autres réplicats au sein du traitement. La priorité est d'avoir le nombre recommandé de réplicats de couples reproducteurs pour chaque traitement (12) et chez les témoins (24). Les poissons présentant des anomalies apparentes (problèmes de vessie natatoire, malformations spinales, tailles extrêmes, etc.) sont à écarter lors de la mise en place des couples reproducteurs. Lors de la phase de reproduction à la génération F1, chaque cuve réplicat doit contenir un seul couple reproducteur.

***Prélèvement de subadultes et évaluation des effets mesurés****Prélèvement de couples non reproducteurs*

44. Après la constitution des couples reproducteurs, les poissons non sélectionnés pour la reproduction sont euthanasiés, afin de mesurer les effets à la semaine d'essai 12-13 (F1). Il est extrêmement important de manipuler les poissons de telle sorte que le sexe génotypique déterminé pour la sélection des couples reproducteurs puisse encore être tracé pour chaque poisson. Toutes les données recueillies sont analysées dans le contexte du sexe génotypique de chaque individu. Chaque poisson est utilisé pour une série de mesures incluant : la détermination du taux de survie des poissons juvéniles/subadultes (semaines d'essai 7-12/13 (F1)), la croissance en longueur (il est possible de mesurer la taille standard si la nageoire caudale a été raccourcie lors du prélèvement tissulaire visant à déterminer le sexe génétique ; on mesurera la longueur totale si le prélèvement n'a porté que sur la partie dorsale ou ventrale de la nageoire caudale) et la masse corporelle (à savoir le poids frais, à sec), l'ARNm *vtg* (ou la VTG) hépatique et les papilles de la nageoire anale (voir les tableaux 1 et 2). Il faut noter que le poids et la longueur des couples reproducteurs sont également requis pour le calcul de la croissance moyenne au sein d'un groupe traité.

*Prélèvement tissulaire et mesure de la vitellogénine*

45. Le foie est extrait par dissection et stocké à  $\leq -70$  °C jusqu'à la mesure de l'ARNm *vtg* (ou de la VTG). La queue du poisson, y compris la nageoire anale, est conservée dans un fixateur approprié (de Davidson, par exemple) ou photographiée de telle sorte qu'il soit possible de compter plus tard les papilles de la nageoire anale. On peut si on le souhaite prélever également d'autres tissus (gonade, par exemple) et les conserver. La concentration de VTG hépatique doit être quantifiée par une technique ELISA homologue (voir [annexe 9](#)). Une autre solution consiste à quantifier l'ARNm *vtg*, par extraction de l'ARNm du gène *vtg I* d'un prélèvement hépatique et quantification du nombre de copies du gène *vtg I* (par ng d'ARNm total), par PCR quantitative, selon les méthodes établies par l'U.S. EPA (31). Au lieu de déterminer le nombre de copies du gène *vtg* dans les groupes témoins et les groupes traités, une méthode plus économique en ressources et moins difficile du point de vue technique consiste à déterminer le changement relatif (facteur multiplicatif), dans l'expression du gène *vtg I*, entre groupe témoin et groupes traités.

### *Caractères sexuels secondaires*

46. Dans des circonstances normales, seul le médaka mâle sexuellement mature présente des papilles, qui se développent sur les plaques de jonction de certains rayons de la nageoire anale et constituent un caractère sexuel secondaire pouvant servir de biomarqueur pour les effets perturbateurs endocriniens. La méthode de comptage des papilles de la nageoire anale (nombre de plaques de jonction présentant des papilles) est décrite à l'[annexe 10](#). Le nombre de papilles de la nageoire anale par individu est en outre utilisé pour classer les individus comme phénotype externe mâle ou femelle et établir ainsi un sex-ratio simple pour chaque réplicat. Tout médaka présentant un nombre de papilles supérieur à 0 est défini comme mâle tout médaka présentant 0 papille au niveau de la nageoire anale est défini comme femelle.

### ***Évaluation de la fécondité et de la fertilité***

47. La fécondité et la fertilité sont évaluées lors des semaines 1 à 3 à la génération F0 et des semaines 15 à 17 à la génération F1. Les œufs de chaque couple reproducteur sont récoltés chaque jour pendant 21 jours consécutifs. Ils sont retirés avec précaution de sous le ventre des femelles (placées dans un filet) et/ou siphonnés du fond de l'aquarium tous les matins. La fécondité et la fertilité sont consignées chaque jour pour chaque couple réplicat. La fécondité est définie comme le nombre d'œufs pondus, et la fertilité est définie fonctionnellement comme le nombre d'œufs fécondés en pourcentage de la fertilité au moment du comptage. Le comptage doit intervenir dès que possible après la récolte.

48. La fécondité des réplicats est consignée chaque jour, c'est le nombre d'œufs par couple reproducteur ; l'analyse par les procédures statistiques recommandées porte sur les moyennes des réplicats. La fertilité des réplicats est la somme des nombres d'œufs fertilisés produits par un couple reproducteur divisée par la somme des nombres d'œufs produits par ce couple. Statistiquement, la fertilité est analysée comme un taux par réplicat. Le taux d'éclosion des réplicats correspond au nombre d'alevins divisé par le nombre d'embryons chargés (20 généralement). Statistiquement, le taux d'éclosion est analysé comme un taux par réplicat.

### ***Prélèvement d'adultes et évaluation des effets mesurés***

#### *Prélèvement de couples reproducteurs*

49. Après la semaine d'essai 17 (c'est-à-dire après le démarrage réussi de la génération F2), les adultes F1 sont euthanasiés et divers effets sont évalués (voir tableaux 1 et 2). La nageoire anale est examinée pour évaluer les papilles (voir [annexe 8](#)), et/ou la queue est retirée au niveau immédiatement postérieur à l'orifice anal et fixée pour un comptage ultérieur des papilles. Une partie de la nageoire caudale peut être prélevée et archivée à ce moment-là pour vérification du sexe génétique (*dmy*), si on le souhaite. Il est possible de pratiquer si nécessaire un prélèvement tissulaire pour répéter la recherche du *dmy* et vérifier le sexe génétique de certains poissons. La cavité corporelle est ouverte pour qu'il soit possible de pratiquer une perfusion avec des fixateurs appropriés (de Davidson, par exemple) avant immersion du corps entier dans le fixateur. Cependant, si une étape de perméabilisation appropriée est réalisée avant la fixation, il n'est pas nécessaire d'ouvrir la cavité corporelle.

#### *Histopathologie*

50. Chaque poisson fait l'objet d'une évaluation histopathologique à la recherche de pathologies du tissu gonadique (31) (37). Comme on l'a vu au paragraphe 35, des effets mécanistiques évalués dans cet essai (VTG, CSS et certains effets histopathologiques gonadiques) peuvent être influencés par une toxicité systémique ou autre. L'évaluation histopathologique détaillée du foie et des reins peut donc aider à

comprendre les réponses au niveau des effets mécanistiques mesurés. Cependant, si ces évaluations détaillées ne sont pas réalisées, les anomalies macroscopiques observées incidemment lors de l'évaluation histopathologique doivent être relevées et consignées dans le rapport. Une « lecture descendante », depuis le groupe le plus exposé (par rapport aux témoins) jusqu'au traitement sans effet, peut être envisagée ; il est cependant recommandé de se reporter au document d'orientation sur l'histopathologie (37). En règle générale, les coupes histologiques de tous les prélèvements sont préparées avant d'être lues par le pathologiste. Si l'on utilise une « lecture descendante », il est noté que la procédure Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices (RSCABS) est fondée sur l'anticipation d'une augmentation de l'impact biologique (de la pathologie) lorsque les niveaux de dose augmentent. On perd donc de la puissance si l'on considère uniquement une dose élevée, sans aucune dose intermédiaire. Si une analyse statistique n'est pas nécessaire pour déterminer que la dose élevée est sans effet, cette approche peut être acceptable. Le phénotype gonadique découle également de cette évaluation.

#### *Autres observations*

51. Le test MEOGRT fournit des données utilisables (par exemple dans une approche fondée sur l'analyse du poids de la preuve) pour évaluer simultanément au moins deux grands types de voies intervenant dans les effets indésirables (*adverse outcome pathways*, AOP) qui aboutissent à des effets sur la reproduction : (a) des voies à médiation endocrine impliquant une perturbation de l'axe endocrinien hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) ; et (b) des voies se traduisant par une réduction de la survie, de la croissance (longueur et poids) et de la reproduction du fait d'une toxicité à médiation non endocrine. Des effets classiquement mesurés dans les essais de toxicité chronique tels que l'essai sur le cycle de vie complet et l'essai sur les premiers stades de la vie sont également inclus dans cet essai et peuvent être utilisés pour évaluer les dangers présentés à la fois par les modes d'action toxique à médiation non endocrine et les modes d'action endocrinien toxiques. Au cours de l'essai, il convient d'observer quotidiennement les comportements, et tout comportement inhabituel doit être noté. De plus, toute mortalité doit être notée et on calculera la survie de la F1 jusqu'à la sélection des poissons (semaine d'essai 6/7), la survie après la sélection de la F1 jusqu'au prélèvement subadulte (9-10 spf) et la survie de la F1 depuis la constitution des couples jusqu'au prélèvement de poissons adultes.

**Tableau 1.** Effets mesurés dans le test MEOGRT\*

Stade de la vie	Effet mesuré	Génération
Embryon (2 spf)	Éclosion (% et délai d'éclosion)	F1, F2
Juvenile (4 spf)	Survie (éclosion à 4 spf)	F1
Subadulte (9 ou 10 spf)	Survie (4 à 9 ou 10 spf)	F1
	Croissance (longueur et poids)	
	Vitellogénine <sup>b</sup> (ARNm ou protéine)	
	Caractères sexuels secondaires (papilles de la nageoire anale)	
	Sex-ratio externe	
	Délai jusqu'à la 1 <sup>re</sup> ponte <sup>a</sup>	
Adulte (12-14 spf)	Reproduction (fécondité, œufs fertilisés et fertilité)	F0, F1
Adulte (15 spf)	Survie (de 9 à 15 spf)	F1
	Croissance (longueur et poids)	
	Caractères sexuels secondaires <sup>b</sup> (papilles de la nageoire anale)	
	Histopathologie <sup>b</sup> (gonade, foie, rein)	

\*Ces effets mesurés doivent faire l'objet d'une analyse statistique

<sup>a</sup>Cet effet est observé après établissement des couples reproducteurs.

<sup>b</sup>Ces effets peuvent ne pas être requis à moins que l'essai est effectué à des fins de test sur les perturbateurs endocriniens. Le sponsor de l'étude devra se mettre en relation avec les autorités réglementaires pour établir si une exemption est appropriées pour ces effets avant de débiter l'essai.

## DEROULEMENT CHRONOLOGIQUE

52. Le tableau 2 illustre le déroulement chronologique de l'essai. Le test MEOGRT comprend 4 semaines d'exposition des adultes F0 et 15 semaines d'exposition de la génération F1, ainsi qu'une période d'exposition de la seconde génération (F2) jusqu'à l'éclosion (2 spf). L'[annexe 11](#) récapitule les différentes étapes de l'essai du début à la fin du test MEOGRT.



Tableau 2. Chronologie de l'exposition et des effets mesurés au cours du test MEOGRT.

MEOGRT : chronologie de l'exposition et des effets mesurés																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Semaine d'essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Stade de la vie					Embryon				Larve				Juvénile			Subadulte		Adulte	
Effets mesurés																			
Fécondité	F <sub>0</sub>														F <sub>1</sub>				
Fertilité	F <sub>0</sub>														F <sub>1</sub>				
Éclosion				F <sub>1</sub>														F <sub>2</sub>	
Survie				F <sub>1</sub>							F <sub>1</sub>					F <sub>1</sub>			
Croissance				F <sub>0</sub>							F <sub>1</sub>					F <sub>1</sub>			
Vitellogénine												F <sub>1</sub>							
Carac. sex. secondaires												F <sub>1</sub>					F <sub>1</sub>		
Histopathologie															F <sub>1</sub>				
Semaine d'essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- **Plan expérimental : 7 groupes de réplicats**
  - 5 traités par le produit chimique testé
  - 2 témoins (4 si un solvant est utilisé)
- **Plan intragroupe :**
  - 12 réplicats pour la reproduction, la pathologie adulte et les CSS (sem. 10 à 18)
  - 6 réplicats pour l'éclosion, la survie, la Vtg ; et CSS et croissance subadultes (sem. 1 à 9)

CSS : caractères sexuels secondaires ; sem. : semaines ; Vtg : vitellogénine

## RÉSULTATS ET RAPPORT

### Analyse statistique

53. Le sexe génotypique étant déterminé pour tous les poissons de l'essai, les données doivent être analysées séparément pour chaque sexe génotypique (mâles XY et femelles XX). Le non-respect de cette exigence réduirait grandement la puissance statistique de l'analyse. Il est préférable d'effectuer ces analyses statistiques en suivant les procédures décrites dans le document de l'OCDE sur les méthodes actuelles d'analyse statistique des données d'écotoxicité (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, (38). L'annexe 12 fournit des orientations pour l'analyse statistique.

54. La conception de l'essai et le choix des tests statistiques doivent assurer la puissance requise pour permettre de déceler les changements d'importance biologique concernant les effets pour lesquels une CSEO doit être établie (38). La consignation dans le rapport des concentrations et paramètres ayant un effet significatif peut dépendre du cadre réglementaire. Il convient d'identifier pour chaque effet mesuré quel pourcentage de changement il importe de détecter ou d'estimer. Le plan expérimental doit être adapté en conséquence. Il est peu probable que la même variation en pourcentage s'applique à tous les effets mesurés, et que l'on puisse concevoir une expérience réalisable qui remplisse ces critères pour tous les

effets mesurés, aussi importe-t-il, lors de la conception de l'expérience, de se concentrer sur les effets qui sont importants pour cette dernière. On trouvera à l'[annexe 10](#) un ordinogramme d'analyse statistique et des orientations destinés à faciliter le traitement des données et le choix des tests ou modèles statistiques les plus appropriés. D'autres méthodes statistiques peuvent être utilisées si elles sont scientifiquement fondées.

55. Il sera nécessaire d'analyser les variations au sein de chaque ensemble de réplicats en utilisant l'analyse de la variance ou des méthodes avec tableau de contingence, ainsi que des méthodes d'analyse statistique suffisantes et adaptées fondées sur cette analyse. Pour opérer des comparaisons multiples entre les résultats obtenus pour chaque concentration et ceux obtenus avec les témoins, une procédure descendante (test de Jonckheere-Terpstra, par exemple) est recommandée en cas de réponses continues. Si les données ne sont pas compatibles avec une relation concentration-réponse monotone, le test de Dunnett ou le test de Dunn sera utilisé (après transformation adéquate des données, si nécessaire).

56. Pour la fécondité, le décompte des œufs a lieu chaque jour, mais peut être analysé dans sa globalité ou comme une mesure répétée. L'[annexe 12](#) précise comment analyser ces données. Pour les données histopathologiques exprimées sous la forme d'indices de gravité, un nouveau test statistique, le Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) a été développé (38).

57. Tout effet mesuré dans les groupes traités par le produit chimique qui diffère de façon significative de témoins appropriés doit être consigné dans le rapport.

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

#### *Niveaux de traitement compromis*

58. Plusieurs facteurs entrent en jeu pour déterminer si un réplicat ou l'intégralité d'un traitement présentent des signes d'une toxicité manifeste et s'il convient alors de les exclure de l'analyse. Une toxicité manifeste se caractérise par une mortalité supérieure à quatre individus dans un réplicat de la F1 entre 3 spf et 9 spf, mortalité qui ne saurait être imputable à une erreur technique. Les autres signes de toxicité manifeste sont notamment les hémorragies, les comportements anormaux, les nages anormales, l'anorexie ainsi que tout autre signe clinique de maladie. Pour les signes sub-létaux de toxicité, des évaluations qualitatives peuvent être nécessaires et devraient toujours être réalisées en référence au groupe témoin pour l'eau de dilution (eau pure). Si une toxicité manifeste apparaît dans le(s) groupe(s) le(s) plus exposé(s), il est recommandé d'écarter ces traitements de l'analyse.

#### *Témoins avec solvant*

59. L'utilisation d'un solvant ne doit être envisagée qu'en dernier ressort, après avoir considéré toutes les autres options pour l'administration du produit chimique. Si un solvant est utilisé, il est impératif de mettre en place conjointement un témoin pour l'eau de dilution, en suivant le Guide OCDE No. 23 (15) (voir aussi le paragraphe 15). A la clôture de l'essai, les effets potentiels du solvant font l'objet d'une comparaison. Pour cela, les résultats correspondant au groupe témoin avec solvant sont comparés à ceux du groupe témoin avec eau de dilution. Les relevés d'observation les plus pertinents dans ce cadre concernent les déterminants de la croissance (poids), qui peuvent être affectés en cas d'effets toxiques généralisés. Si des différences statistiquement significatives sont décelées pour ces paramètres entre le groupe témoin avec eau de dilution et le groupe témoin avec solvant, un avis d'expert doit permettre de déterminer si la validité de l'essai est compromise. Si les deux témoins diffèrent, les groupes exposés au produit chimique doivent être comparés au témoin avec solvant, sauf si l'on sait qu'il est préférable de les comparer au témoin avec eau de dilution. S'il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes témoins, il est recommandé de comparer les groupes exposés au produit chimique testé

avec l'ensemble des deux groupes (témoin solvant et témoin eau de dilution), sauf si l'on sait qu'il est préférable de les comparer soit au groupe témoin avec eau de dilution soit au témoin avec solvant.

### **Rapport d'essai**

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

#### *Produit chimique testé : nature physique et propriétés physico-chimiques pertinentes :*

- Données d'identification chimique.
- Substance mono-constituant :  
apparence physique, hydro-solubilité et autres propriétés physico-chimiques pertinentes ;  
identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).
- Substance multi-constituants, UVBC (de composition inconnue ou variable, les produits de réaction complexe, ou les matériaux d'origine biologique) et mélanges :  
caractérisés autant que possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

#### *Espèce soumise à l'essai :*

- Nom scientifique, souche (si possible), origine et méthode de collecte des œufs fécondés et de manipulation ultérieure.

#### *Conditions d'essai :*

- Photopériode(s) ;
- Conception de l'essai : dimensions des enceintes, matériel et volume d'eau, nombre d'enceintes d'essai et de réplicats, nombre d'alevins par réplicat, etc. ;
- Méthode de préparation des solutions mère et fréquence de renouvellement (l'agent solubilisant et sa concentration doivent être indiqués le cas échéant) ;
- Méthode de dosage du produit chimique testé : pompes doseuses, systèmes de dilution, etc. ;
- Efficacité de récupération de la méthode et concentrations d'essai nominales, limite de quantification, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types dans les récipients d'essai, méthode analytique utilisée et données montrant que les mesures se réfèrent aux concentrations du produit chimique testé en solution vraie ;
- Caractéristiques de l'eau de dilution : pH, dureté, température, concentration d'oxygène dissous, taux de chlore résiduel (si mesuré), carbone organique total (si mesuré), solides en suspension (si mesurés), salinité du milieu d'essai (si mesurée) et toute autre mesure effectuée ;
- Concentrations d'essai nominales, moyennes des valeurs mesurées avec leurs écarts-types ;
- Qualité de l'eau dans les récipients d'essai : pH, température (quotidiennement) et concentration d'oxygène dissous ;

- Informations détaillées sur l'alimentation : types d'aliments, provenance, quantité distribuée et fréquence, etc.

*Résultats :*

- Données attestant que les témoins répondent à l'ensemble des critères de validité ;
  - Données relatives au groupe témoin (plus témoin avec solvant le cas échéant) et aux groupes traités : éclosion (taux et délai d'éclosion) pour F1 et F2, survie après éclosion pour F1, survie de ;a F0 et de la F1, croissance (longueur et poids corporel) pour F1, sexe génotypique et différenciation sexuelle (par exemple caractères sexuels secondaires d'après les papilles de la nageoire anale et l'histologie gonadique) pour F1, sexe phénotypique pour F1, caractères sexuels secondaires (papilles de la nageoire anale) pour F1, ARNm de la *vtg* (ou protéine VTG) pour F1, évaluation histopathologique (gonade, foie et rein) pour F1 et reproduction (fécondité et fertilité) pour F0, F1 ; (voir les tableaux 1 et 2) ;
  - Méthodes d'analyse statistique (analyse de régression ou analyse de la variance) et de traitement des données (tests et modèles statistiques utilisés) ;
  - Concentration sans effet observé (CSEO) pour chacune des réponses évaluées ;
  - Concentration minimale avec effet observé (CMEO) pour chacune des réponses évaluées (à  $p=0.05$ ) ;  $CE_x$  pour chacune des réponses évaluées, le cas échéant, et intervalles de confiance (à 90 % ou 95 %), graphique du modèle ajusté utilisé pour calculer la  $CE_x$ , pente de la courbe concentration-réponse, formule du modèle de régression, estimation des paramètres du modèle et de leurs erreurs-types ;
  - Tout écart par rapport à la Ligne directrice et aux critères d'acceptation, et considérations relatives aux conséquences susceptibles d'en découler pour les résultats de l'essai.
1. En ce qui concerne les résultats de la mesure des effets, on présentera les valeurs moyennes et leurs écarts-types (par réplicat et par concentration, si possible).

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment, No. 171, [ENV/JM/MONO\(2012\)16](#), OCDE, Paris.
2. Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. *Current Protocols in Toxicology* 39: 1-36.
3. OCDE (2018), Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, No. 150, OCDE Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>.
4. Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. *Water Research* 16: 457–464.
5. Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-1930.
6. Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2552-2560.
7. Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17 $\beta$ -Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Chemosphere* 47: 71–80.
8. Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1692-1698.
9. Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-Tert-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1487-1496.
10. Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006)a. Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 $\beta$ -Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. *Aquatic Toxicology* 79: 288-295.
11. Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006)b. Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17 $\beta$ -Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. *Aquatic Toxicology* 77: 78-86.
12. Nakamura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). *Journal of Applied Toxicology* 35:11-23.
13. U.S. Environmental Protection Agency. (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Available at: [<https://www.regulations.gov/docket/EPA-HQ-OPP-2013-0182/document> 1].
14. Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. *Chemosphere* 86: 593-599.
15. OCDE (2019), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Test Chemicals, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23 (Second Edition), [ENV/JM/MONO\(2000\)6/REV1](#), OCDE, Paris.

16. Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Review. Aquatic Toxicology* 76: 69–92.
17. Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.
18. Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). *Biology of Reproduction* 61: 1287-1293.
19. Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*, Wiley- Blackwell.
20. Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 330-338.
21. OCDE (2019), Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>.
22. OCDE (2012), Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185265-en>.
23. OCDE (2013), Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203785-en>.
24. OCDE (1998), Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OCDE Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070141-en>.
25. OCDE (2009), Test No. 230: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OCDE Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264076228-en>.
26. OCDE (2011), Test No. 234: Fish Sexual Development Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OCDE Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264122369-en>.
27. OCDE (2013), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OCDE Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>.
28. Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
29. Flynn K, Swintek J, Johnson R. (2017) The Influence of Control Group Reproduction on the Statistical Power of the Environmental Protection Agency's Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 136: 8-13.
30. Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301-308.
31. U.S. EPA (2015) OCSPP 890.2200: Medaka Extended One Generation Reproduction Test, Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines, EPA No.740-C-15-002. Available at: [https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0576-0019].
32. Sebire M, Davis JE, Hatfield R, Winberg S and Katsiadaki I (2015). Prozac affects stickleback nest quality without altering androgen, spiggin or aggression levels during a 21-day breeding test. *Aquatic Toxicology*, 168:78-89.

33. Breacker C, Barber I, Norton WHJ, McDearmid JR and Tilley CA. (2017). A Low-Cost Method of Skin Swabbing for the Collection of DNA Samples from Small Laboratory Fish. *Zebrafish*, 14(1): 35–41.
34. Díaz C, Böhle G, Wege F, Teigeler M and Eilebrecht E. (2019). Fast Multiplex real time PCR method for sex-identification of medaka (*Oryzias latipes*) by non-invasive sampling. *MethodsX*, 6: 587–593.
35. Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Scharf M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
36. Shinomiya A, Otake H, Togashi K, Hamaguchi S and Sakaizumi M (2004), Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, *Zoological Science* 21: 613-619.
37. OCDE (2015), Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Series on Testing and Assessment. No. 227. [ENV/JM/MONO\(2015\)36/PART1](#), [ENV/JM/MONO\(2015\)36/PART2](#), [ENV/JM/MONO\(2015\)36/PART3](#), [ENV/JM/MONO\(2015\)36/PART4](#), OCDE, Paris.
38. Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

ANNEXE 1

## DÉFINITIONS

**Axe HHG** : axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

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

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

**Concentration minimale avec effet observé (CMEO)** : concentration la plus basse d'un produit chimique testé à laquelle on observe un effet statistiquement significatif (à  $p < 0,05$ ) par comparaison avec le témoin. Cependant, toutes les concentrations d'essai supérieures à la CMEO devraient avoir un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la CMEO. Si ces deux conditions ne sont pas réunies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la CMEO (et donc de la CSEO). Les annexes 5 et 6 donnent des indications à ce sujet.

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

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

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

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

**Fécondité** : nombre d'œufs.

**Fertilité (ou taux de fertilité)** : nombre d'œufs viables/fécondité.

**IACUC** : Comité institutionnel du soin et de l'utilisation des animaux (*Institutional Animal Care and Use Committee*)

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

**Longueur à la fourche (LF)** : longueur mesurée de l'extrémité du museau à l'extrémité du rayon central de la nageoire caudale, utilisée lorsqu'il est difficile de dire où se termine la colonne vertébrale du poisson ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

**Longueur standard (LS)** : longueur mesurée de l'extrémité du museau à l'extrémité postérieure de la dernière vertèbre ou à l'extrémité postérieure de la partie médio-latérale de la plaque hypurale. Autrement dit, cette mesure ne prend pas en compte la longueur de la nageoire caudale ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

**Longueur totale (LT)** : longueur de l'extrémité du museau à l'extrémité du lobe le plus long de la nageoire caudale, généralement mesurée après avoir comprimé les lobes le long de la ligne médiane. La mesure se fait en ligne droite, sans suivre la courbe du corps ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

**Œufs fertilisés** : œufs présentant un soulèvement de la membrane de fertilisation (chorion), une



division cellulaire en cours ou la formation de blastule .

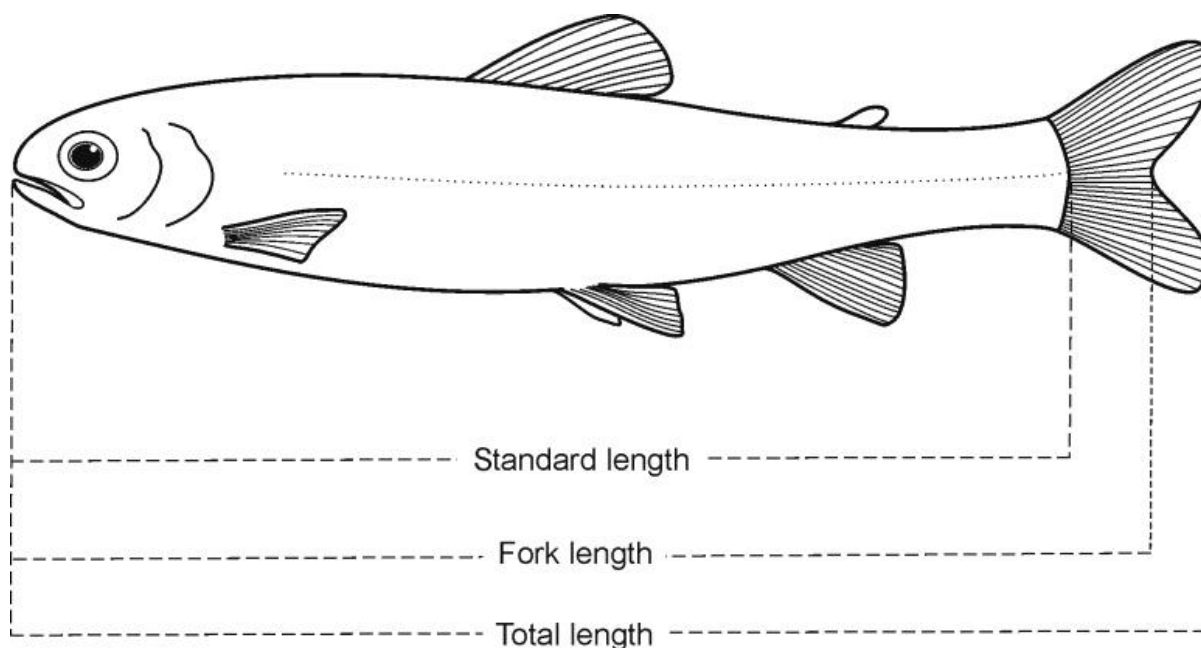


Figure 1 : Description des différentes longueurs utilisées

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

**SPF** : semaine post-fécondation

**Taux d'éclosion** : alevins/nombre d'embryons chargés dans un incubateur.

**Taux de charge** : poids frais de poisson par volume d'eau.

**UVCB** : substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériaux biologiques.

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

ANNEXE 2

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

Substance	Concentration limite
Matière particulaire	5 mg/L
Carbone organique total	2 mg/L
Ammoniac non ionisé	1 µg/L
Chlore résiduel	10 µg/L
Pesticides organophosphorés totaux	50 ng/L
Pesticides organochlorés totaux plus polychlorobiphényles	50 ng/L
Chlore organique total	25 ng/L
Aluminium	1 µg/L
Arsenic	1 µg/L
Chrome	1 µg/L
Cobalt	1 µg/L
Cuivre	1 µg/L
Fer	1 µg/L
Plomb	1 µg/L
Nickel	1 µg/L
Zinc	1 µg/L
Cadmium	100 ng/L
Mercure	100 ng/L
Argent	100 ng/L

ANNEXE 3**CONDITIONS D'ESSAI POUR LE TEST MEOGRT**

1. Espèce recommandé	Médaka japonais ( <i>Oryzias latipes</i> )
2. Type d'essai	Dynamique (flux continu)
3. Température de l'eau	La température nominale de l'essai est de 25 °C. La température moyenne dans chaque cuve pendant toute la durée de l'essai est de 24-26 °C
4. Qualité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (large spectre et ~150 lumens/m <sup>2</sup> ) (~150 lux)
5. Photopériode	16 h de lumière pour 8 h d'obscurité
6. Taux de charge	F0 : 2 adultes/réplikat ; F1 : démarrage avec au maximum 20 œufs (embryons)/réplikat, réduit à 12 embryons/réplikat à l'éclosion puis 2 adultes (couple reproducteur XX-XY) à 9-10 spf pour la phase de reproduction
7. Volume utile minimal des enceintes d'essai	1.8 L (exemple de dimensions d'une enceinte : 18x9x15 cm)
8. Renouvellement de la solution d'essai, en volume	Minimum de 5 renouvellements en volume/jour jusqu'à 16 renouvellements en volume /jour (ou débit de 20 mL/min)
9. Âge des organismes d'essai au démarrage	F0 : > 12 spf sans dépasser de préférence 16 spf
10. Nombre d'organismes par réplikat	F0 : 2 poissons (couple mâle et femelle) ; F1 : maximum 20 poissons (œufs)/réplikat (produits par les couples reproducteurs F0 et F1)
11. Nombre de traitements	5 traitements par le produit chimique testé plus témoin(s) approprié(s)
12. Nombre de réplikat par traitement	Minimum de 6 réplikat par traitement pour le produit chimique testé et minimum de 12 réplikat pour le témoin, ainsi que pour le témoin avec solvant le cas échéant (le nombre de réplikat est doublé pendant la phase de reproduction à la génération F1 : au minimum 12 réplikat par traitement pour le produit chimique testé et au minimum 24 réplikat pour les témoins).
13. Nombre d'organismes par essai	Minimum de 84 poissons à la génération F0 et 504 à la génération F1 (en cas de témoin avec solvant, 108 poissons pour F0 et 648 pour F1) ; l'unité de comptage est le post-éléuthéro-embryon.
14. Régime alimentaire	Les poissons sont nourris d'artémies ( <i>Artemia</i> spp., nauplii âgés de 24 heures) <i>ad libitum</i> , complétées si nécessaire par des aliments en flocons du commerce (on trouvera à l'annexe 6 un exemple de régime alimentaire assurant une croissance et un développement adéquats pour une reproduction soutenue)

15. Aération  
Aucune, sauf si l'oxygène dissous tend vers des valeurs inférieures à 60 % de la valeur de saturation en air
16. Eau de dilution  
Eau de surface propre, eau de source ou eau reconstituée, ou eau du robinet déchlorée
17. Période d'exposition  
En principe 19 semaines (de F0 à l'éclosion de F2)
18. Effets biologiques mesurés (principaux)  
Taux d'éclosion (F1 et F2) ; survie (F1, de l'éclosion à 4 spf (fin des larves/début des juvéniles), de 4 à 9 (ou 10) spf (du début des juvéniles aux subadultes) et de 9 à 15 spf (de subadultes à euthanasie des adultes)) ; croissance (F1, longueur et poids à 9 et 15 spf) ; caractères sexuels secondaires (F1, papilles de la nageoire anale à 9 et 15 spf) ; vitellogénine (F1, ARNm *vtg* ou protéine VTG à 15 spf) ; sexe phénotypique (F1, via l'histologie des gonades à 15 spf) ; reproduction (F0 et F1, fécondité et fertilité pendant 21 jours) ; délai d'éclosion (F1) ; histopathologie (F1, gonade, foie et rein à 9 spf)
19. Critères de validité de l'essai  
Oxygène dissous  $\geq 60$  % de la valeur de saturation en air ; température moyenne de l'eau de 24-26 °C pendant tout l'essai ; reproduction réussie  $\geq 65$  % des femelles chez le(s) témoin(s) ; fécondité quotidienne moyenne  $\geq 20$  œufs chez le(s) témoin(s) ; taux de fécondité  $\geq 80$  % (en moyenne) chez les témoins (dans chacune des générations F1 et F2) ; survie après éclosion jusqu'à 3 spf  $\geq 80$  % (en moyenne) et de 3 spf jusqu'à l'euthanasie de la génération  $\geq 90$  % (en moyenne) chez les témoins (F1), la concentration du produit chimique testé en solution doit être maintenue de façon satisfaisante dans un intervalle de  $\pm 20\%$  autour de la valeur moyenne des mesures.

ANNEXE 4**EXEMPLES DE VALEURS OBTENUES CHEZ LES TÉMOINS**

Il faut noter que les valeurs suivantes obtenues chez les témoins reposent sur un nombre limité d'études de validation, et pourront être corrigées à la lumière de données nouvelles.

Croissance

Le poids et la longueur sont mesurés sur tous les poissons prélevés à 9 (ou 10) et 15 semaines post-fécondation (spf). Selon ce protocole, le poids frais attendu à 9 spf est de 85-145 mg pour les mâles et de 95-150 mg pour les femelles. Le poids attendu à 15 spf est de 250-330 mg pour les mâles et de 280-350 mg pour les femelles. S'il peut y avoir des écarts notables par rapport à ces plages pour certains individus, un poids moyen chez les témoins s'écartant notablement de ces valeurs, en particulier s'il est inférieur, suggérera des problèmes d'alimentation, de régulation de la température, de qualité de l'eau ou de maladie, ou une combinaison de plusieurs de ces facteurs.

Éclosion

Le taux d'éclosion chez les témoins se situe généralement autour de 90 %, bien que des valeurs ne dépassant pas 80 % ne soient pas exceptionnelles. Un taux d'éclosion inférieur à 75 % peut être le signe d'une agitation insuffisante des œufs au cours de leur développement ou de soin insuffisant apporté aux œufs, tel qu'un retrait trop tardif des œufs morts entraînant une infestation fongique.

Survie

Les taux de survie jusqu'à 3 spf depuis l'éclosion et après 3 spf sont généralement de 90 % ou plus chez les témoins, mais des taux de survie ne dépassant pas 80 % aux premiers stades de la vie chez les témoins ne sont pas alarmants. Des taux de survie inférieurs à 80 % sont préoccupants et peuvent indiquer un nettoyage insuffisant des aquariums, entraînant la perte de larves par maladie ou asphyxie due à de faibles niveaux d'oxygène dissous. La mortalité peut aussi résulter de blessures lors du nettoyage des cuves ou de la perte de larves dans le système de vidange des cuves.

Gène de la vitellogénine

Si les niveaux absolus de gène de la vitellogénine (*vtg*), exprimés en nombre de copies/ng d'ARNm total, peuvent varier considérablement entre laboratoires selon les procédures ou l'instrumentation utilisées, le niveau de *vtg* devrait être près de 200 fois plus élevé chez les témoins femelles que chez les témoins mâles. Il n'est pas rare que ce ratio atteigne 1 000 à 2 000, cependant des ratios inférieurs à 200 sont suspects et peuvent indiquer des problèmes de contamination des échantillons ou des problèmes liés à la procédure et/ou aux réactifs utilisés.

Caractères sexuels secondaires

Pour les mâles, la plage normale des caractères sexuels secondaires, définis comme le nombre total de segments avec papilles dans les rayons de la nageoire anale, est de 40-80 segments à 9-10 spf. A 15 spf, la plage devrait être de 80-120 chez les mâles et 0 chez les témoins femelles. Pour des raisons inexplicables, dans de rares cas, certains mâles ne présentent pas de papilles

à 9 spf, mais comme tous les témoins mâles développent des papilles à 15 spf, cela tient probablement à un retard de développement. La présence de papilles chez les témoins femelles indique la présence de mâles XX dans la population.

#### Mâles XX

L'incidence normale de mâles XX chez les poissons de culture semble être de l'ordre de 4 % au maximum à 25 °C, cette incidence augmentant lorsque la température augmente. Il convient de prendre des mesures pour limiter la proportion de mâles XX dans la population. L'incidence des mâles XX ayant une composante génétique et étant par conséquent transmissible, un moyen efficace de réduire l'incidence des mâles XX dans la population est de surveiller l'élevage et de veiller à ce que des mâles XX ne soient pas utilisés pour la reproduction.

#### Activité reproductrice (frai)

Le frai chez les réplicats témoins doit être suivi quotidiennement avant l'évaluation de la fécondité. On peut évaluer visuellement, d'un point de vue qualitatif, si les couples témoins frayent. A 12-14 spf, la plupart des couples témoins devraient frayer. Si le nombre de couples frayant est faible à ce stade, cela indique des problèmes potentiels de santé, de maturité ou de bien-être des poissons.

#### Fécondité

A 12-14 spf, la femelle médaka en bonne santé et bien nourrie pond généralement chaque jour de 15 à 50 œufs. La production d'œufs pour 16 des 24 couples reproducteurs témoins recommandés (> 65 %) devrait dépasser 20 œufs par couple et par jour et peut atteindre quelque 40 œufs par jour. Une production inférieure peut indiquer des problèmes d'immaturité, de malnutrition ou de mauvaise santé des couples reproducteurs.

#### Fertilité

Le pourcentage d'œufs fertilisés chez les couples reproducteurs témoins est généralement de l'ordre de 90 %, des valeurs de 95 % et plus n'étant pas rares. Des taux de fertilité inférieurs à 80 % chez les œufs témoins sont suspects et peuvent signaler soit des individus en mauvaise santé, soit des conditions de culture laissant à désirer.

## Bibliographie

- 1) Flynn K, Swintek J, Johnson R. (2017) The Influence of Control Group Reproduction on the Statistical Power of the Environmental Protection Agency's Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 136: 8-13.

## ANNEXE 5

## EXEMPLE DE RÉGIME ALIMENTAIRE

On trouvera au **tableau 1** un exemple de régime alimentaire assurant une croissance et un développement adéquats pour une reproduction soutenue. Il est possible de s'écarter du régime proposé mais il est alors recommandé de procéder à des tests afin de s'assurer que la croissance et la reproduction sont acceptables. Pour suivre le régime suggéré, il faut, avant de commencer l'essai, déterminer le poids sec d'artémies par volume de purée semi-liquide d'artémies. Pour cela, peser un volume donné de cette purée après l'avoir séchée pendant 24 heures à 60 °C sur des plateaux pré-pesés. Pour tenir compte du poids du sel dans la purée semi-liquide, il convient de sécher et peser également un volume identique de la solution salée utilisée dans la purée semi-liquide, et de soustraire le poids du sel du poids obtenu pour la purée d'artémies séchée. Une autre solution consiste à filtrer et rincer les artémies à l'eau distillée avant de les sécher, ce qui évite d'avoir à mesurer le poids d'un échantillon contenant uniquement du sel. Ces informations permettent de convertir les données du tableau 1 (poids sec d'artémie) en volume de purée semi-liquide d'artémies à administrer à chaque poisson. Il est en outre recommandé de peser chaque semaine des aliquotes de purée d'artémies pour vérifier que le poids sec administré est correct.

**Tableau 1.** Exemple de régime alimentaire.

Jours (après éclosion)	Artémies (mg poids sec/poisson/jour)
Jour 1	0.5
Jour 2	0.5
Jour 3	0.6
Jour 4	0.7
Jour 5	0.8
Jour 6	1.0
Jour 7	1.3
Jour 8	1.7
Jour 9	2.2
Jour 10	2.8
Jour 11	3.5
Jour 12	4.2
Jour 13	4.5
Jour 14	4.8
Jour 15	5.2
Jour 16-21	5.6
Semaine 4	7.7
Semaine 5	9.0
Semaine 6	11.0
Semaine 7	13.5

# OECD/OCDE

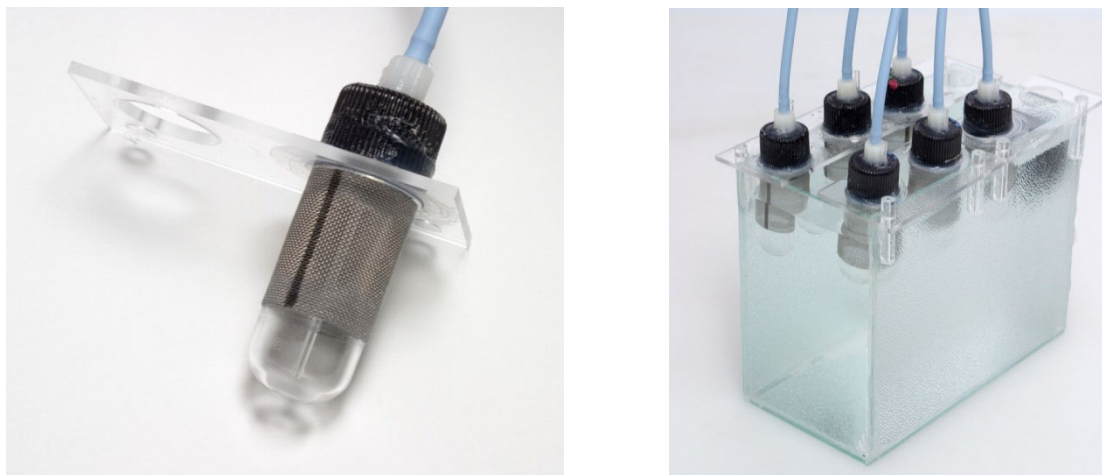
240

Semaine 8-sacrifice	22.5
---------------------	------

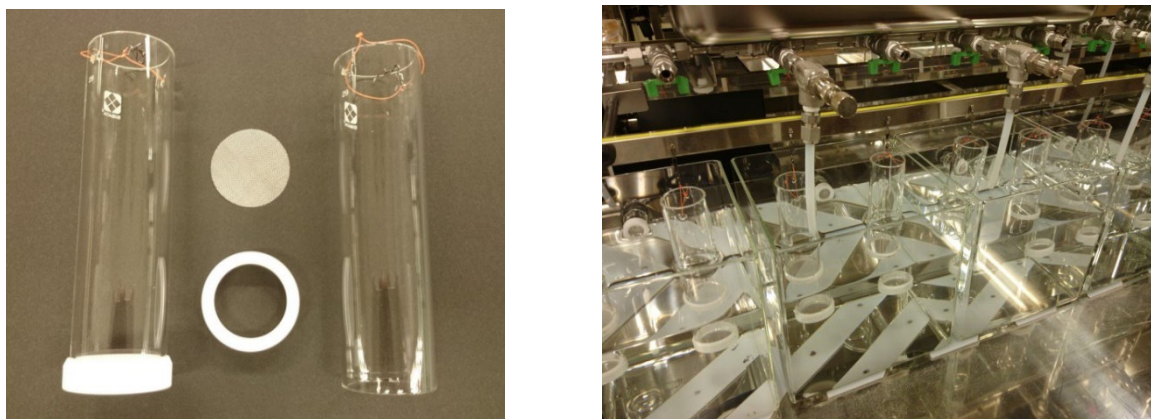


ANNEXE 6

## EXEMPLES DE CHAMBRES D'INCUBATION DES ŒUFS

Exemple A

Cet incubateur consiste en un tube à centrifuger en verre présentant une découpe transversale, connecté par un manchon en acier inoxydable et maintenu à son sommet par un bouchon vissant pour centrifugeuse. Un petit tube en verre ou en acier inoxydable traversant le bouchon et positionné près du fond arrondi de l'incubateur assure une diffusion douce de bulles d'air ayant pour fonction de mettre les œufs en suspension et de réduire la transmission par des organismes saprophytes d'infections fongiques entre les œufs, tout en facilitant les échanges chimiques entre l'incubateur et la cuve où il est placé.

Exemple B

Cet incubateur est constitué d'un corps cylindrique en verre (5 cm de diamètre et 10 cm de hauteur) et d'une grille métallique inoxydable (0.25  $\phi$  et 32 mesh) maintenue au fond du corps cylindrique par un anneau en PTFE. Les incubateurs sont suspendus par une barre à mouvement vertical au-dessus d'un réservoir et agités verticalement (avec une amplitude de 5 cm environ) selon un cycle approprié pour les œufs de médaka (une fois toutes les 4 secondes environ).

ANNEX 7

SCHÉMA DU REGROUPEMENT ET DE LA RÉPARTITION DES RÉPLICATS SELON LA LIGNE DIRECTRICE MEOGRT

Traduction des termes du schéma :

Effets mesurés											
Écllosion		Survie			Croissance, VTG, CSS		Reproduction, pathologie, CSS		Écllosion		
F0	F1										F2
XX XY	Regroupe- ment œufs viables	20 œufs	Regroupe- ment alevins	12 poissons	DMY évalué	Prélève- ment subadultes	12 XX	XX XY	Regroupe- ment œufs viables	20 œufs	
	Répartition		Répartition				12 XY		Répartition		

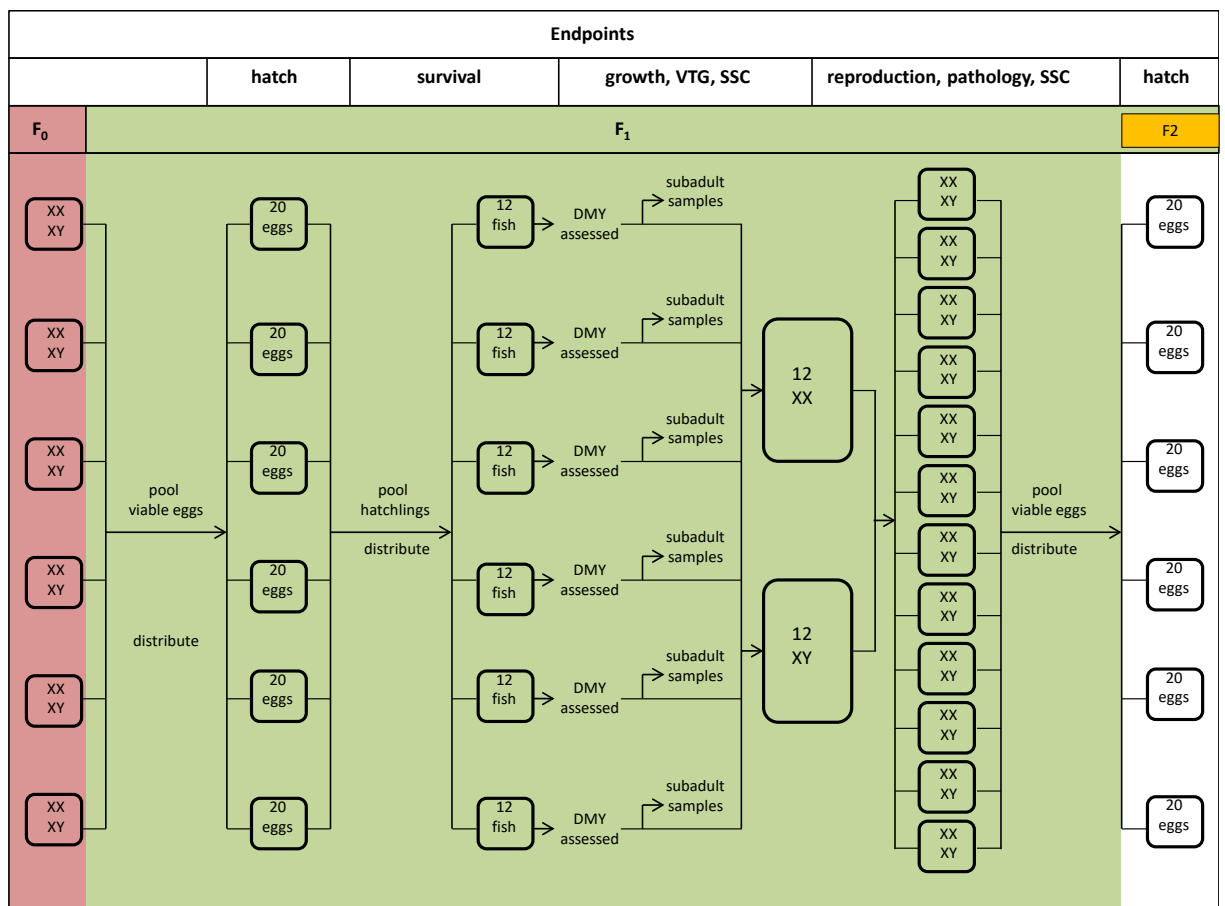


Figure 1. Regroupement et répartition des répliqués du début à la fin du test MEOGRT. Ce graphique représente un traitement, ou la moitié d'un groupe témoin. Du fait des regroupements, l'identité des répliqués n'est pas continue du début à la fin de l'essai. Le terme « œufs » désigne les œufs viables fertilisés (équivalent à embryons).

**Traitements et répliation.** Cette ligne directrice recommande cinq traitements par le produit chimique testé (produit de qualité technique) et un témoin négatif. Le nombre de réplicats par traitement n'est pas constant du début à la fin du test MEOGRT, et le nombre de réplicats dans le groupe témoin est deux fois plus élevé que dans chacun des groupes traités. A la génération F0, chaque groupe traité par produit chimique testé comprend six réplicats alors que le groupe témoin négatif compte 12 réplicats. Les solvants sont fortement déconseillés ; si un solvant est utilisé, cette utilisation et le choix du solvant doivent être justifiés dans le rapport d'essai. En outre, si un solvant est utilisé, deux types de témoins sont nécessaires : a) un témoin avec solvant, et b) un témoin négatif. Ces deux groupes témoins devront comporter chacun tous les réplicats prévus aux différentes étapes du déroulement du test MEOGRT. Cette structure de réplicats reste inchangée tout au long du développement de l'organisme d'essai à la génération F1 (et F2 jusqu'à l'éclosion). Toutefois, au stade adulte, lorsque les couples reproducteurs F1 sont constitués, le nombre de réplicats de couples reproducteurs par traitement est doublé pour un résultat optimal ; il y a donc 12 couples réplicats par groupe traité par produit chimique testé et 24 couples réplicats dans le groupe témoin (ainsi que 24 couples réplicats dans le groupe témoin solvant, le cas échéant). Les couples reproducteurs doivent être établis sur la base d'individus génétiquement confirmés (c.à.d. un individu XX et un individu XY) dans chaque traitement. La détermination de l'éclosion des embryons pondus par les couples F1 se fait sur la même structure de réplicats que pour les embryons pondus par les couples F0, à savoir initialement six réplicats par groupe traité par produit chimique testé et 12 réplicats dans le(s) groupe(s) témoin.

ANNEXE 8**RECOMMANDATION POUR LE PRÉLÈVEMENT TISSULAIRE POUR LA DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE PAR RÉACTION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRISE (PCR)*****Prélèvement, préparation et stockage des tissus avant détermination du sexe génétique par réaction en chaîne par polymérase (PCR) chez le medaka (préparé par le laboratoire pour les organismes aquatiques de Bayer CropScience AG)***

1. Couper la nageoire anale ou dorsale de chaque poisson à l'aide de ciseaux à fine lame et la placer dans un tube rempli de 100 µl de tampon d'extraction 1 (la préparation du tampon est détaillée ci-dessous). Nettoyer les ciseaux après chaque poisson dans un bécher rempli d'eau distillée puis les sécher avec du papier absorbant.
2. Homogénéiser les nageoires avec un pilon de micro-tube en teflon pour lyser les cellules. Pour chaque tube, utiliser un pilon neuf pour éviter toute contamination. Placer les pilons une nuit dans 0.5 M de NaOH, les rincer 5 minutes dans de l'eau distillée puis les conserver dans de l'éthanol ou en milieu stérile après passage en autoclave jusqu'à utilisation.
3. Il est également possible de stocker les nageoires sans tampon d'extraction 1 sur de la glace carbonique puis dans un réfrigérateur à une température de -80°C pour éviter toute dégradation de l'ADN. Néanmoins, l'extraction se fait mieux si l'on extrait l'ADN simultanément (pour la manipulation, voir ci-dessus ; décongeler les échantillons sur de la glace après conservation à une température de -80°C avant de remplir les tubes de tampon).
4. Après avoir homogénéisé tous les tubes, les mettre au bain-marie puis les porter à ébullition pendant 15 minutes à une température de 100°C.
5. Remplir chaque tube de 100 µl de tampon d'extraction 2 (la préparation du tampon est détaillée ci-dessous) à l'aide d'une pipette. Conserver les échantillons à température ambiante pendant 15 minutes et, pendant ce temps, les remuer délicatement de temps en temps avec la main.
6. Remettre ensuite tous les tubes au bain-marie puis les porter de nouveau à ébullition pendant 15 minutes à une température de 100°C.
7. En attendant l'analyse plus approfondie, congeler les tubes à -20°C.

***Préparation des tampons :***

1. Tampon 1 utilisé pour la réaction PCR :
  - a. 500 mg de N-Lauroylsarcosine (Merck KGaA, Darmstadt, GE, par exemple)
  - b. 2 ml 5M de NaCl
  - c. ajouter 100 ml d'eau distillée  
→ autoclaver
2. Tampon 2 utilisé pour la réaction PCR :
  - a. 20 g de Chelex (Biorad, Munich, GE, par exemple)
  - b. Gonfler dans 100 ml d'eau distillée  
→ autoclaver

**Détermination du sexe génétique (par PCR) chez le medaka (préparé par le laboratoire pour les organismes aquatiques de Bayer CropScience AG et Biozentrum de l'université de Würzburg)**

Décongeler les tubes préparés et congelés (tel que décrit dans la partie précédente) sur de la glace. Ensuite, centrifuger les tubes avec une centrifugeuse Eppendorf (30 sec à vitesse maximale, à température ambiante). Pour la PCR, utiliser le surnageant clair séparé du précipité. Veiller absolument à ce qu'aucune trace de Chelex (situé dans le précipité) ne soit transférée vers la réaction PCR, car cela provoquerait des interférences avec l'activité de la Taq polymérase. Utiliser directement le surnageant ou le congeler (à -20 °C) puis le faire de nouveau décongeler suivant plusieurs cycles sans effet négatif sur l'ADN pour les analyses ultérieures.

1. Préparation du « mélange réactif » (25 µl par échantillon) :

	Volume	Concentration finale
Modèle d'ADN	0.5 µl-2 µl	
tampon 10x pour PCR avec MgCl <sub>2</sub>	2.5 µl	1x
Nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Amorce sens (10 µM) (voir ci-dessous 3-5)	0.5 µl	200 nM
Amorce anti-sens (10 µM) (voir ci-dessous 3-5)	0.5 µl	200 nM
DMSO	1.25 µl	5 %
Eau (classe PCR)	jusqu'à 25 µl	
Taq E- Polymérase	0.3 µl	1.5 U

Tampon 10x pour PCR avec MgCl<sub>2</sub> : 670 mM de Tris/HCl (pH 8.8 à 25°C), 160 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % de Tween 20/acide laurique

Pour chaque PCR (voir ci-dessous 3-5), on a besoin de l'amorce spéciale comme nouvelle combinaison de « mélange réactif » et du volume adéquat nécessaire de modèle d'ADN pour chaque échantillon (voir ci-dessus). Les volumes respectifs seront transférés dans de nouveaux tubes à l'aide de pipettes. Les tubes seront ensuite fermés, agités (10 s environ) et centrifugés (10 s à température ambiante). À ce moment, les programmes de PCR respectifs pourront être initiés. De plus, un témoin positif (échantillon d'ADN servant d'exemple, dont l'activité est connue et les résultats sont clairs) et un témoin négatif (1 µl d'eau distillée) seront utilisés dans chaque programme de PCR.

2. Préparation du gel d'agarose (1 %) – Pendant le fonctionnement des programmes de PCR :

- Dissoudre 3 g d'agarose dans 300 ml de solution tampon TAE 1x (gel d'agarose 1 %)
- Porter cette solution à ébullition aux micro-ondes (2-3 min environ)
- Transférer la solution chaude dans un moule spécial posé sur de la glace
- Au bout de 20 minutes environ, le gel d'agarose est prêt à l'emploi
- Stocker le gel d'agarose dans la solution tampon TAE 1x jusqu'à la fin des programmes de PCR.

3. Programme de PCR pour actines :

Cette réaction PCR vise à démontrer que l'ADN présent dans l'échantillon n'est pas détérioré.

- Amorces spécifiques :
  - "M act 1(upper/forward)" → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA
  - "M act 2(lower/reverse)" → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG
- Programme :
  - 5 min à 95 °C
  - Cycle (35 fois) :
    - Dénaturation → 45 sec à 95 °C
    - Hybridation → 45 sec à 56 °C
    - Élongation → 1 min à 68 °C
  - 15 min à 68 °C

4. Programme de PCR pour gènes X et Y :

Les échantillons dont l'ADN est intact seront utilisés dans ce programme de PCR pour détecter les gènes X et Y. L'ADN des mâles comporte une double bande et l'ADN des femelles une seule bande (après coloration et électrophorèse sur gel d'agarose). Si l'on utilise ce programme, on intégrera un témoin positif pour les mâles (échantillon XY) et un pour les femelles (échantillon XX).

- Amorces spécifiques :
  - "PG 17.5" (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG
  - "PG 17.6" (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA
- Programme :
  - 5 min à 95 °C
  - Cycle (40 fois) :
    - Dénaturation → 45 sec à 95 °C
    - Hybridation → 45 sec à 55 °C
    - Élongation → 1 min 30 sec à 68 °C
  - 15 min à 68 °C

5. Programme de PCR pour gènes Y servant de « témoin » pour le programme de PCR pour gènes X et Y :

Ce programme permet de vérifier les résultats du « programme de PCR pour gènes X et Y ». Les « échantillons mâles » doivent comporter une bande et les "échantillons femelles" ne doivent en comporter aucune (après coloration et électrophorèse sur gel d'agarose).

- Amorces spécifiques :
  - "DMTYa (upper/forward)" → GGC CGG GTC CCC GGG TG

- “DMTYd (lower/reverse)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G
  - Programme :
    - 5 min à 95 °C
    - Cycle (40 fois) :
      - Dénaturation → 45 sec à 95 °C
      - Hybridation → 45 sec à 56 °C
      - Élongation → 1 min à 68 °C
    - 15 min à 68 °C
6. Coloration des échantillons de PCR :
- Solution de coloration :
    - 50 % de glycérine
    - 100 mM d'EDTA
    - 1 % de SDS
    - 0.25 % de bleu de bromophénol
    - 0.25 % de xylène cyanol
  - Verser 1 µl de cette solution dans chaque tube à l'aide d'une pipette.
7. Début de l'électrophorèse sur gel d'agarose :
- Transférer la préparation de gel d'agarose 1 % dans une enceinte d'électrophorèse sur gel remplie de tampon TAE 1x
  - Verser 10-15 µl de chaque échantillon de PCR coloré dans une fente de gel d'agarose à l'aide d'une pipette
  - Verser 5-15 µl de 1kb-“Ladder”(Invitrogène) dans une fente séparée à l'aide d'une pipette
  - Commencer l'électrophorèse avec 200 V
  - Arrêter au bout de 30-45 min
8. Détermination des bandes :
- Nettoyer le gel d'agarose avec de l'eau distillée.
  - Transférer le gel d'agarose dans du bromure d'éthidium pendant 15-30 min
  - Photographier le gel d'agarose exposé à des rayonnements ultra-violets
  - Analyser les échantillons en les comparant à la bande/aux bandes témoin(s) positive(s) et à l'échelle

ANNEXE 9**PROCÉDURES RECOMMANDÉES POUR LES PRÉLÈVEMENTS EFFECTUÉS  
À DES FINS DE DOSAGE DE LA VITELLOGÉNINE**

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

**Medaka japonais, excision du foie**

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

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

Excision du foie

- (1) Transférer les poissons d'essai du conteneur de transport vers la solution anesthésique avec l'épuisette.
- (2) Après anesthésie, saisir les poissons d'essai avec des pincettes (de modèle courant) pour les déposer sur le papier filtre (ou essuie-tout). En saisissant les poissons, appliquer les pincettes sur les côtés de la tête pour éviter de casser la queue.
- (3) Essuyer l'eau de la surface des poissons d'essai avec le papier filtre (ou essuie-tout).
- (4) Placer les poissons sur le dos. Pratiquer ensuite une petite incision transversale entre la région ventre-nuque et le milieu de l'abdomen avec des ciseaux à dissection.



- (5) Introduire les ciseaux à dissection dans la petite incision, et inciser l'abdomen le long de sa ligne médiane, depuis un point caudal par rapport au manteau branchial jusqu'au côté cranien de l'anus. Attention à ne pas introduire les ciseaux à disséquer trop profondément pour ne pas abîmer le foie et la gonade.
- (6) Mener les opérations suivantes sous le stéréomicroscope.
- (7) Placer les poissons sur le dos sur l'essuie-tout (ou une boîte de Pétri en verre ou une lame de verre).
- (8) Ecarter les parois de la cavité abdominale avec les pincettes de précision puis extérioriser les organes internes. Il est également possible d'extérioriser les organes internes en retirant l'une des parois de la cavité abdominale si nécessaire.
- (9) Etaler la partie qui relie le foie et la vésicule biliaire à l'aide d'une autre paire de pincettes de précision. Saisir ensuite le canal biliaire et couper la vésicule biliaire. Veiller à ne pas rompre la vésicule biliaire.
- (10) Saisir l'œsophage et exciser les intestins du foie selon la même méthode. Veiller à ce que le contenu du tube digestif ne s'échappe pas. Exciser l'intestin caudal de l'anus et retirer le tractus de la cavité abdominale.
- (11) Retirer la masse de tissus graisseux et autres situés à la périphérie du foie. Prendre soin de ne pas abîmer le foie.
- (12) Saisir la zone de la porte hépatique avec les pincettes de précision et retirer le foie de la cavité abdominale.
- (13) Placer le foie sur la lame de verre. A l'aide des pincettes de précision, retirer les autres tissus graisseux et étrangers (paroi abdominale interne, par exemple), s'il y a lieu, de la surface du foie.
- (14) Peser le foie au moyen d'une balance de précision électronique, en utilisant comme tare un microtube de 1.5 ml. Consigner la valeur sur la feuille de travail (précision à 0.1 mg près). Confirmer les informations d'identification sur l'étiquette du microtube.
- (15) Fermer le capuchon du microtube contenant le foie. Stocker le microtube dans un bac de refroidissement (ou un bac de glace).
- (16) Après chaque excision de foie, nettoyer les instruments de dissection ou les remplacer par des instruments propres.
- (17) Retirer le foie de tous les poissons se trouvant dans les conteneurs de transport comme indiqué ci-dessus.
- (18) Après excision du foie de tous les poissons se trouvant dans le conteneur de transport (c'est-à-dire de tous les mâles et de toutes les femelles d'une enceinte d'essai), placer tous les spécimens hépatiques sur un support pour tubes muni

d'une étiquette d'identification puis les stocker dans un congélateur. Lorsque les foies sont fournis pour pré-traitement peu de temps après leur excision, les spécimens sont transportés jusqu'au poste de travail le plus proche dans un bac de refroidissement (ou un bac de glace).

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

### Spécimens

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

Fig-1

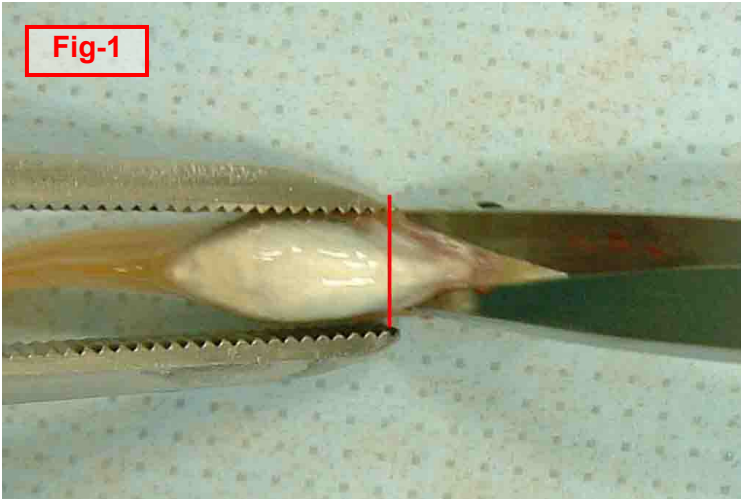


Fig-1

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

Fig-2

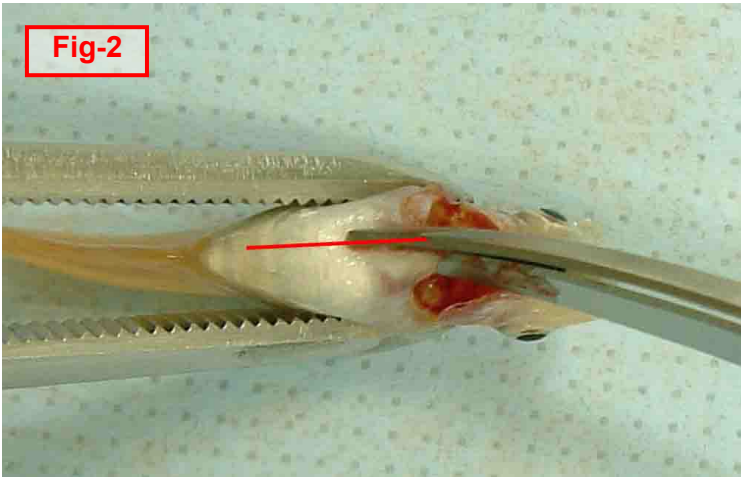


Fig-2

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

Fig-3

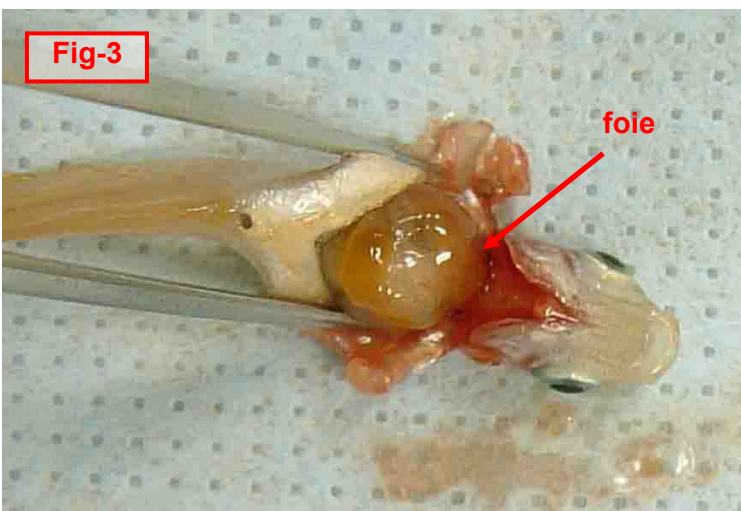
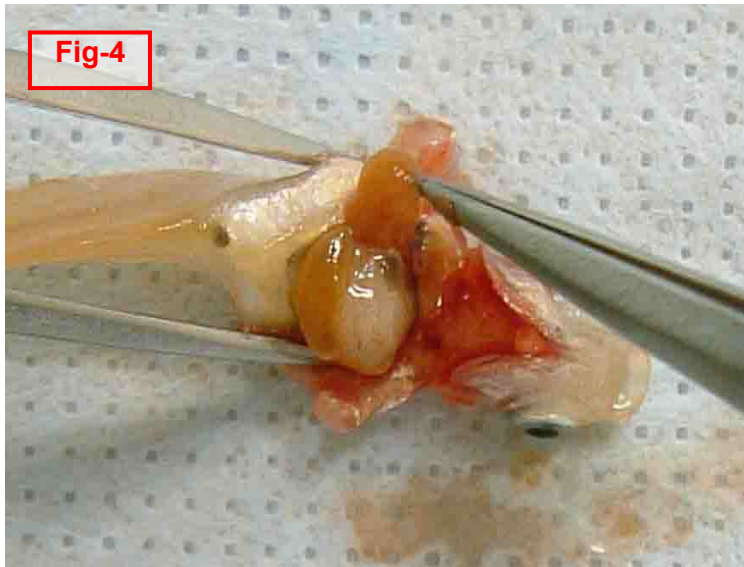


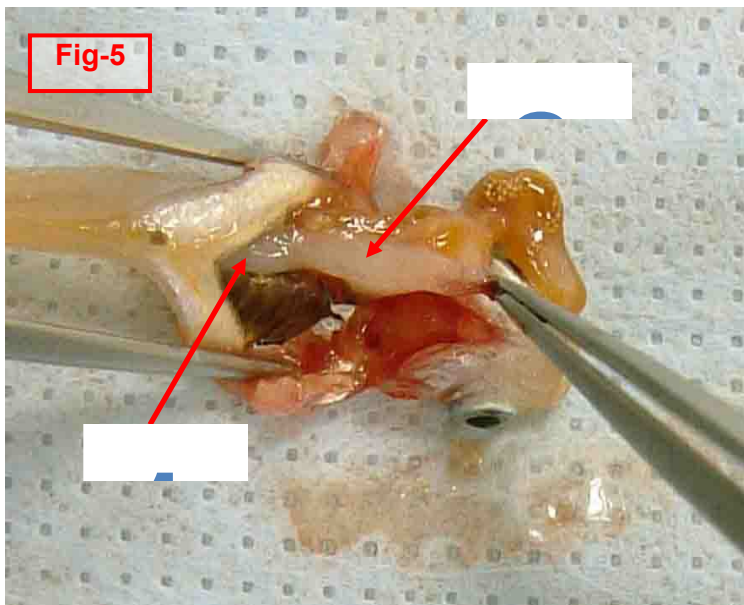
Fig-3

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



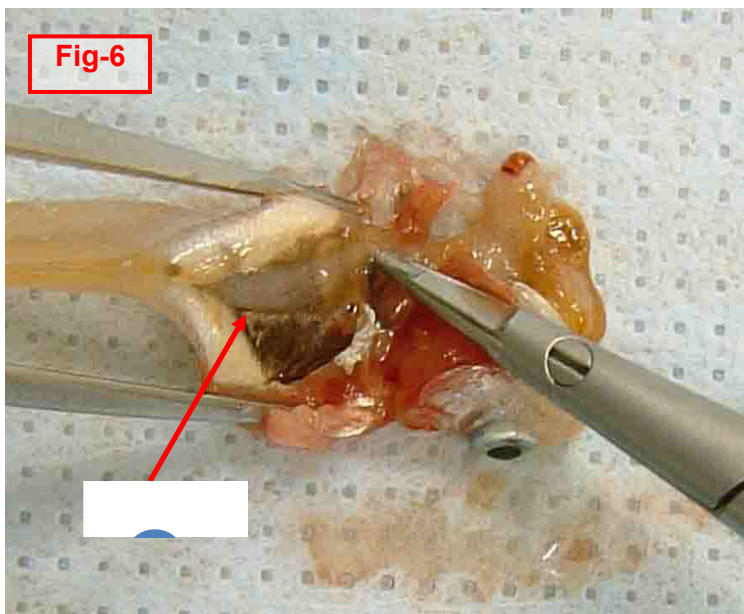
**Fig-4**

**Le foie est disséqué et excisé avec des pincettes.**



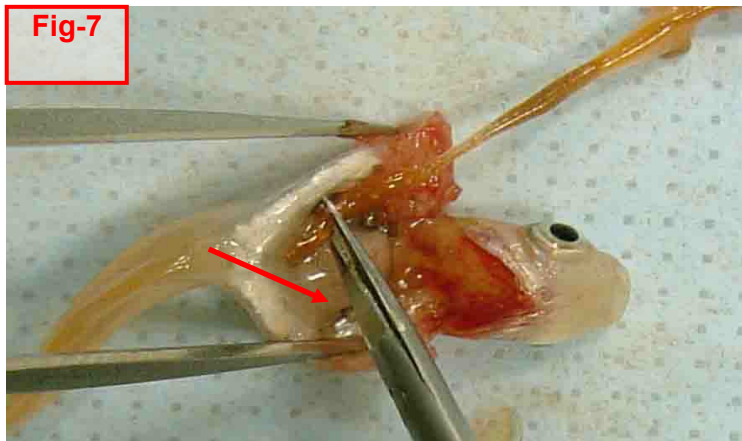
**Fig-5**

**Les intestins sont délicatement retirés avec des pincettes.**



**Fig-6**

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

**Fig-7 (femelle)**

La procédure est identique pour les femelles.

**Fig-8**

Procédure achevée.

### ***Medaka japonais (Oryzias latipes), pré-traitement du foie pour le dosage de la vitellogénine***

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

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

#### **Préparation du foie pour le pré-traitement**

(1) Retirer le microtube de 1.5 ml contenant le foie du congélateur juste avant le pré-

traitement.

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

#### Déroulement du pré-traitement

##### 1 Ajout du tampon d'homogénéisation

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

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

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

##### 2 HOMOGÉNÉISATION DU FOIE

- (1) Attacher un nouveau pilon d'homogénéisation à l'homogénéisateur du microtube.
- (2) Introduire le pilon dans le microtube de 1.5 ml. Maintenir l'homogénéisateur pour presser le foie entre la surface du pilon et la paroi interne du microtube.
- (3) Faire fonctionner l'homogénéisateur pendant 10 à 20 secondes. Conserver le microtube au frais avec de la glace pilée pendant l'opération.
- (4) Retirer le pilon du microtube et laisser reposer pendant une dizaine de secondes. Procéder ensuite à une inspection visuelle de l'état de la suspension.
- (5) Si des morceaux de foie sont observés dans la suspension, répéter les opérations (3) et (4) pour obtenir un homogénéat de foie satisfaisant.
- (6) Conserver l'homogénéat hépatique en suspension dans le bac de glace jusqu'à sa centrifugation.
- (7) Utiliser un pilon neuf pour chaque homogénéat.
- (8) Homogénéiser tous les foies avec un tampon d'homogénéat selon la procédure décrite ci-dessus.

##### 3 CENTRIFUGATION DE L'HOMOGÉNAT HÉPATIQUE EN SUSPENSION

- (1) Confirmer que la température de la centrifugeuse réfrigérée est  $\leq 5^{\circ}\text{C}$ .
- (2) Introduire les microtubes de 1.5 ml contenant l'homogénéat hépatique en suspension

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

#### 4 COLLECTE DU SURNAGEANT

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

#### Stockage des spécimens

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

## ANNEXE 10

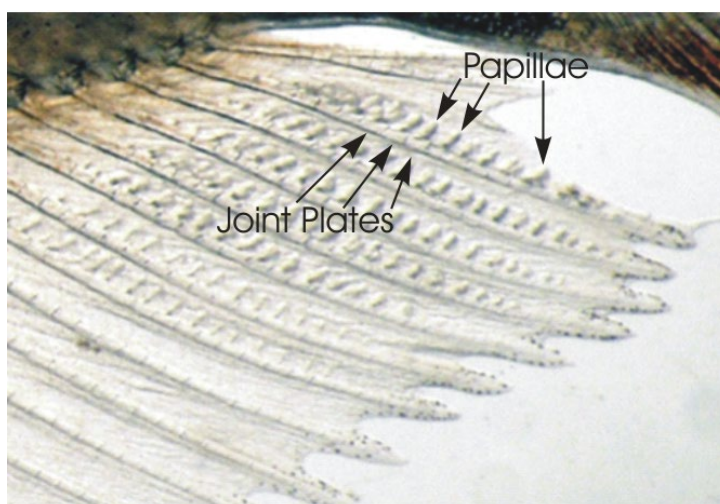
## COMPTAGE DES PAPILLES DE LA NAGEOIRE ANALE

Principaux matériels et réactifs

- Microscope de dissection (avec appareil photo en option)
- Fixateur (de Davidson, par exemple (le liquide de Bouin n'est pas recommandé)), si le comptage ne se fait pas par analyse d'image

Procédures

Après nécropsie, il convient d'obtenir une image de la nageoire anale afin de pouvoir commodément compter les papilles de la nageoire anale. Bien que l'imagerie soit la méthode recommandée, la nageoire anale peut être fixée au fixateur de Davidson ou au moyen d'un autre fixateur approprié pendant 1 minute environ. Il est important de maintenir la nageoire à plat pendant la fixation, pour faciliter le comptage ultérieur des papilles. La carcasse avec la nageoire anale peut être conservée dans le fixateur de Davidson ou un autre fixateur approprié jusqu'à l'analyse. Compter le nombre de plaques de jonction (voir la figure 1) comportant des papilles faisant saillie au niveau du rebord postérieur de la plaque.



**Figure 1.** Papilles de la nageoire anale.



ANNEXE 11

## CHRONOLOGIE DÉTAILLÉE DU TEST MEOGRT

Semaines d'essai 1-3 (F0)

Les poissons reproducteurs de la génération F0 qui ont répondu aux critères de sélection (voir les paragraphes 16-20) sont exposés pendant trois semaines afin que les gamètes et tissus gonadiques en développement soient exposés au produit chimique testé. Chaque cuve de réplicats contient un seul couple reproducteur (couple femelle XX-mâle XY). Les œufs pondus sont récoltés, comptés et leur fertilité est évaluée pendant 21 jours consécutifs, à partir du 1<sup>er</sup> jour d'essai. Afin de protéger les œufs de l'oophagie par les parents avant la collecte, il est recommandé de collecter les œufs aussitôt que possible après la ponte (juste après l'allumage de la lumière).

Semaine d'essai 4 (F0 et F1)

Il est préférable que les œufs fécondés et viables (embryons) soient récoltés sur une seule journée ; cependant, s'il n'y a pas suffisamment d'embryons, ils peuvent être récoltés sur deux jours. Dans ce cas, tous les embryons du même traitement qui ont été récoltés le premier jour sont regroupés avec ceux qui sont récoltés le deuxième jour. Puis la totalité des embryons ainsi regroupés pour chaque traitement est répartie de façon aléatoire dans les incubateurs de réplicats à raison de 20 embryons par incubateur. Les décès d'œufs fécondés (embryons) sont consignés quotidiennement. Les œufs morts sont retirés des incubateurs (la mort des œufs fécondés peut être identifiée, en particulier à un stade précoce, d'après une diminution marquée de la transparence et un changement de coloration, dus à la coagulation et/ou la précipitation des protéines, se traduisant par un aspect blanc opaque ; OCDE 210).

Nota : si un seul traitement nécessite un deuxième jour de récolte, tous les traitements (témoins compris) doivent suivre la même procédure. Si, après le second jour de récolte, le nombre d'embryons est insuffisant, au sein d'un traitement, pour qu'il soit possible de charger 20 embryons par incubateur, on réduira à 15 le nombre d'embryons par incubateur pour ce traitement spécifique. S'il n'y a pas assez d'embryons pour en charger 15 par incubateur, on réduira le nombre d'incubateurs réplicats jusqu'à un nombre permettant de charger 15 embryons par incubateur. Il est en outre possible d'augmenter le nombre de couples reproducteurs par traitement et groupe témoin, à la génération F0, afin de produire plus d'œufs et d'atteindre le nombre recommandé de 20 par réplicat.

Au 24<sup>e</sup> jour d'essai, les couples reproducteurs F0 sont euthanasiés et leurs poids et longueur sont consignés. Il est possible, si nécessaire, de prolonger d'un ou deux jours les couples reproducteurs F0 pour redémarrer la génération F1.

Semaines d'essai 5-6 (F1)

Un ou deux jours avant le début prévisible de l'éclosion, stopper ou réduire l'agitation des œufs en incubation pour accélérer l'éclosion. Des embryons éclosant chaque jour, les alevins sont regroupés par traitement et répartis de façon systématique dans les cuves réplicats destinées aux larves au sein de chaque traitement spécifique, chaque cuve ne devant pas contenir plus de 12 alevins. La répartition se fait de façon aléatoire ; on sélectionne des alevins que l'on place un par un dans des réplicats successifs en les choisissant au hasard, et en passant chaque fois dans le même ordre d'un réplicat du traitement considéré au suivant jusqu'à ce que tous les

réplicats au sein du traitement comportent 12 alevins. S'il n'y a pas suffisamment d'alevins pour remplir tous les réplicats, veiller à ce que le plus grand nombre de réplicats possible comportent 12 alevins pour le démarrage de la phase F1.

Les œufs qui n'ont pas éclos au terme de deux fois le jour médian de l'éclosion chez les témoins sont considérés comme non viables et écartés. Le nombre d'alevins est consigné et le taux d'éclosion est calculé dans chaque répliat.

#### Semaines d'essai 7-11 (F1)

La survie des larves est contrôlée et consignée chaque jour dans tous les réplicats. Au 43<sup>e</sup> jour d'essai, le nombre de poissons survivants dans chaque répliat est consigné, ainsi que le nombre initial d'alevins placés dans le répliat (valeur nominale : douze). Cela permet de calculer le taux de survie depuis l'éclosion jusqu'au stade subadulte. En outre, dans la période menant à la sélection des couples reproducteurs, chaque répliat devra être suivi pour sa première ponte. Le jour de l'essai où survient cette première ponte doit être consigné, mais l'analyse statistique de ces données n'est pas requise.

#### Semaines d'essai 12 (F1)

Au 78<sup>e</sup>-85<sup>e</sup> jour, on procède à un petit prélèvement tissulaire sur la nageoire caudale de chaque poisson afin de déterminer le sexe génotypique de chaque individu. Ces données sont utilisées pour constituer les couples reproducteurs.

Dans les trois jours suivant la détermination du sexe génotypique de chaque poisson, 12 couples reproducteurs par traitement et 24 couples par témoin sont constitués de façon aléatoire. Deux poissons XX et XY de chaque répliat sont sélectionnés de façon aléatoire et regroupés par sexe, puis sélectionnés de façon aléatoire pour constituer les couples reproducteurs (couples XX-XY). Un minimum de 12 réplicats par traitement et un minimum de 24 réplicats pour les témoins sont constitués, avec un couple reproducteur par répliat. Si un répliat ne comporte pas deux poissons XX ou deux poissons XY pouvant être regroupés, des poissons du sexe génotypique requis sont prélevés dans d'autres réplicats du même traitement.

Les poissons restants (au maximum 8 poissons par répliat) sont euthanasiés et prélevés pour la mesure des effets au stade subadulte. Les données relatives au gène *dmy* (XX ou XY) pour tous les prélèvements subadultes sont conservées de telle sorte qu'il soit possible de relier tous les effets mesurés au sexe génétique de chaque individu.

#### Semaines d'essai 13-14 (F1)

L'exposition se poursuit pendant le passage des couples reproducteurs subadultes au stade adulte. Chaque récipient d'essai est suivi chaque matin pour la présence d'œufs (par exemple si le couple reproducteur produit les œufs le matin suivant le placement dans le récipient d'essai, cela est consigné comme le jour 1). Au 98<sup>e</sup> jour d'essai (jour précédant le début de la récolte des œufs), les œufs sont retirés des aquariums et prélevés sur les femelles.

#### Semaines d'essai 15-17 (F1)

Les œufs pondus sont récoltés chaque jour pendant 21 jours consécutifs dans chaque répliat et la fécondité et la fertilité sont évaluées.

#### Semaine d'essai 18 (répétition de la semaine d'essai 4) (F1 et F2)

Au 120<sup>e</sup> jour d'essai, on procède le matin à la récolte des œufs dans chaque répliat. Les œufs

récoltés sont évalués et les œufs fertiles (débarrassés de leurs filaments) de chaque couple reproducteur sont regroupés par traitement et répartis de façon systématique dans les chambres d'incubation à raison de 20 œufs fertiles par incubateur. Les incubateurs peuvent être placés dans des « cuves à incubateurs » séparées pour chaque traitement, ou dans la cuve répliquat qui contiendra les larves écloses, après l'éclosion. Il est préférable que les embryons soient récoltés sur une seule journée ; cependant, si leur nombre est insuffisant, ils peuvent être récoltés sur deux jours. Dans ce dernier cas, tous les embryons d'un traitement qui ont été récoltés le premier jour sont regroupés avec ceux qui sont collectés le deuxième jour. Puis la totalité des embryons de chaque traitement est répartie de façon aléatoire dans les incubateurs répliquats, à raison de 20 embryons par incubateur. Nota : si un seul traitement requiert un second jour de collecte, tous les traitements (témoins compris) doivent suivre la même procédure. Si, après le second jour de récolte, il n'y a pas suffisamment d'embryons au sein d'un traitement pour charger 20 embryons par incubateur, on réduira à 15 le nombre d'embryons par incubateur au sein de ce traitement. S'il n'y a pas suffisamment d'embryons pour en charger 15 par incubateur, on réduira le nombre d'incubateurs répliquats jusqu'à ce qu'il soit possible d'avoir 15 embryons par incubateur.

Au 121<sup>e</sup> jour d'essai (ou au 122<sup>e</sup> jour, si un délai est nécessaire pour le bon démarrage de F2), les couples reproducteurs F1 sont euthanasiés et analysés (mesure des effets au stade adulte). Il est possible, si nécessaire, de prolonger d'un ou deux jours les couples reproducteurs F1 pour redémarrer la génération F2.

#### Semaines d'essai 19-20 (F2)

Un ou deux jours avant le début prévisible de l'éclosion, stopper ou réduire l'agitation des œufs en incubation pour accélérer l'éclosion. Si l'essai se termine à l'éclosion de la génération F2, les alevins sont comptés chaque jour puis écartés. (Les embryons qui n'ont pas éclos après une période d'incubation prolongée, définie comme deux fois le jour médian d'éclosion chez les témoins, sont considérés comme non viables).

ANNEXE 12

## ANALYSE STATISTIQUE

Les types de données biologiques générées lors du test MEOGRT ne sont pas spécifiques de cet essai et, sauf pour les données de pathologie, de nombreuses méthodes statistiques ont été mises au point qui permettent d'analyser correctement ces données selon leurs caractéristiques (normalité, homogénéité des variances, notamment) et selon que les modalités de l'étude se prêtent ou non à la vérification d'hypothèses ou à l'analyse de régression, à des tests paramétriques ou non paramétriques, etc. En règle générale, les analyses statistiques suggérées sont conformes aux recommandations de l'OCDE pour les données d'écotoxicité (OCDE 2006) et l'on trouvera à la figure 2 un diagramme décisionnel pour l'analyse des données du test MEOGRT.

On suppose que les jeux de données de l'essai suivent le plus souvent un modèle de réponse monotone. Il faut en outre examiner si un test statistique unilatéral ou bilatéral doit être utilisé. Il est suggéré d'utiliser un test unilatéral sauf si cette solution ne convient pas pour des raisons biologiques. Des tests statistiques précis sont recommandés dans ce qui suit, mais si des méthodes statistiques plus appropriées et/ou plus puissantes sont développées pour être appliquées aux données spécifiques générées lors du MEOGRT, il y a lieu de les utiliser pour bénéficier des avantages qu'elles présentent.

Les données du test MEOGRT doivent être analysées séparément pour chaque sexe génotypique. Deux stratégies sont envisageables pour analyser les données relatives aux poissons présentant une inversion sexuelle (mâles XX ou femelles XY) : 1) censurer toutes les données relatives aux poissons présentant une inversion sur l'ensemble de l'essai, sauf pour ce qui est de la prévalence de l'inversion dans chaque réplicat ; 2) conserver les données relatives aux poissons présentant une inversion et procéder à l'analyse sur la base du sexe génotypique.

Données histopathologiques

Les données histopathologiques sont consignées sous la forme d'indices de gravité, qui sont évalués par une procédure statistique de conception récente, le Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices (RSCABS) (Green *et al.*, 2014). RSCABS utilise le test de tendance Cochran-Armitage ajusté par l'approche Rao-Scott par étape décroissante, sur chaque niveau de sévérité de la réponse histopathologique. L'ajustement *Rao-Scott* permet de tenir compte des réplicats ; la procédure *by Slices* intègre l'augmentation attendue des indices de gravité lorsque les concentrations d'exposition augmentent. Pour chaque diagnostic, les résultats du RSCABS indiquent quels traitements induisent une prévalence de pathologie accrue par rapport aux témoins et le degré de gravité correspondant.

Données relatives à la fécondité

L'analyse préconisée de la fécondité examine l'impact global sur la fécondité pour la période d'observation de 21 jours. Les données brutes sont enregistrées et présentées dans le rapport d'étude comme la fécondité (nombre total d'œufs) par réplicat pour chaque jour. Le réplicat signifie que les données brutes doivent être calculées, puis une transformation racine carrée appliquée). Les données de fécondité sont analysées selon une procédure descendante (test de Jonckheere-Terpstra ou de Williams) visant à déterminer les effets des traitements, à condition que les données soient compatibles avec une relation concentration-réponse monotone. La procédure descendante permet de faire des comparaisons à un niveau de significativité de 0.05

en évitant les ajustements liés au nombre de comparaisons effectuées. Des données compatibles avec une relation concentration-réponse monotone sont attendues, mais ce point peut être vérifié soit en procédant à un examen visuel des données soit en construisant les contrastes linéaires et quadratiques des moyennes par traitement après hiérarchisation des données. Sauf si le contraste quadratique est significatif alors que le contraste linéaire ne l'est pas, le test de tendance est réalisé. Sinon, le test de Dunnett est utilisé pour déterminer les effets des traitements si les données présentent une distribution normale et des variances homogènes. Si ces conditions ne sont pas remplies, on utilise le test de Dunn avec l'ajustement de Bonferroni-Holm. Tous les tests indiqués sont réalisés indépendamment de tout test global F ou de Kruskal-Wallis. On trouvera dans OCDE 2006 plus de précisions sur ces différents tests.

D'autres méthodes peuvent être utilisées, par exemple un modèle linéaire généralisé avec erreurs de Poisson pour le décompte des œufs (sans transformation), dès lors que cela est justifié du point de vue statistique (Cameron et Trividi, 2013). Dans ce cas, il est recommandé de faire appel à un spécialiste en statistique.

#### Considérations temporelles des effets

Puisque les observations liées à la fécondité sont reportées à travers la période des 21 jours, des considérations temporelles des effets peuvent être importantes pour évaluer les effets principaux du traitement sur la fécondité. Si les effets temporels sont importants sur la fécondité, cela signifie en général que la fécondité non seulement varie en fonction du temps et du traitement mais que les effets de chaque traitement sur la réponse varie à des rythmes différents dans le temps. Il peut également être intéressant d'examiner visuellement les données de fécondité de chaque traitement et/ou réplicat à partir d'un nuage de points représentant la distribution des données dans le temps. Cette méthode permettra une évaluation informelle des effets potentiels dans le temps.

Si une compréhension des effets temporels du traitement est souhaitée pour augmenter les résultats statistiques primaires sur la fécondité, l'analyse statistique suivante peut être appliquée. Le modèle d'analyse de la variance des mesures répétées est donné par  $Y = \text{Traitement} + \text{Temps} + \text{Temps} \times \text{Traitement}$ , avec des effets randomisés du réplicat (traitement) et du Temps  $\times$  réplicat (Traitement) (voir Green et al. (2016) et Swintek 92020) pour plus d'information). Ici le facteur temps se réfère à la fréquence des comptages d'œufs (par exemple, en semaine). Ceci représente une analyse de mesures répétées, comprenant une corrélation entre les observations sur le même réplicat comptant pour la nature « mesures répétées » des données (voir Green et al, 2018).

Le modèle comprend une interaction Temps  $\times$  Traitement. Si l'interaction est non significative alors les effets principaux du traitement sont évalués par un test de Dunnett (ou Dunnett-Hsu), qui ajuste selon le nombre de comparaisons. Si l'interaction Temps  $\times$  traitement est significative à  $p=0.05$ , alors tout résultat sur les effets principaux doit être interprété en fonction de cette interaction. Par exemple, un effet principal du traitement peut ne pas être statistiquement significatif même si le traitement a un impact significatif sur le résultat. Les tests sur les effets principaux ou contrastes simple sur les effets principaux ont une interprétation limitée en présence d'une interaction significative avec l'effet mesuré. Les effets des traitements doivent être évalués à l'intérieur de chaque tranche de temps du tableau ANOVA avec une comparaison multiple appropriée (par exemple, si la tranche dans la semaine 15 est significative à  $p=0.05$ , alors les traitements de cette semaine 15 sont comparés au moyen du test de Dunnett à  $p=0.05$ ).

Des instructions similaires s'appliquent pour tester la variable Temps. Si l'effet principal Temps est significatif à  $p=0.05$ , alors la comparaison par paire à travers les niveaux de ce facteur Temps (par exemple la comparaison des semaines pondérées à travers les traitements ou au sein d'un même traitement) peut être testée à  $p=0.05$  avec un ajustement convenable (p. ex. Tukey HSD). Utilisant le facteur Jour comme facteur Temps n'est pas recommandé car cela augmenterait de façon grossière le taux de faux négatifs à cause d'un ajustement brut Bonferroni ou Bonferroni-Holme pour un grand nombre de comparaisons par paires (considérant jusqu'à 210).

Pour terminer, pour les comparaisons ne remplissant aucunes des catégories ci-dessus, les comparaisons doivent être ajustées au moyen d'une méthode appropriée telles que l'ajustement Bonferroni-Holm à la valeur de  $p$ . Plus de détails sur les analyses de ces modèles peuvent être trouvés dans Green et al. (2018), Hocking (1985), et Hochberg et Tamhane (1987).

#### Analyse de toutes les autres données biologiques

Les analyses statistiques sont fondées sur l'hypothèse que si les doses ont été correctement sélectionnées, les données seront monotones. Leur monotonie est établie quand elles sont formellement évaluées d'après les contrastes linéaires et quadratiques. Si les données sont monotones, il est recommandé de procéder à un test de tendance de Jonckheere-Terpstra sur les médianes des réplicats (conseillé *in* OCDE 2006). Si le contraste quadratique est significatif mais que le contraste linéaire ne l'est pas, les données sont considérées comme non monotones.

Si les données sont non monotones, en particulier du fait d'une réponse réduite pour le traitement le plus élevé ou les deux traitements les plus élevés, il faut envisager de censurer le jeu de données considéré et de procéder à l'analyse sans ces traitements. Cette décision nécessite un avis d'expert et doit être fondée sur toutes les données disponibles, en particulier celles qui indiquent une toxicité manifeste à ces niveaux de traitement.

Pour le poids et la longueur, il n'est pas recommandé de transformer les données, bien que cela puisse occasionnellement être nécessaire. En revanche, une transformation logarithmique est recommandée pour les données relatives à la vitellogénine ; une transformation racine carrée est recommandée pour les données relatives aux CSS (papilles de la nageoire anale) ; une transformation arc sinus racine carrée est recommandée pour les données relatives au taux d'éclosion, au taux de survie, au sex-ratio et au pourcentage d'œufs fertiles. Le délai avant éclosion et le délai avant la première ponte doivent être traités comme des données de type « délai avant événement » : les embryons n'éclosant pas pendant la période fixée ou les réplicats ne pondant jamais sont traités comme des données censurées à droite. Le délai avant éclosion doit être calculé à partir du jour médian d'éclosion de chaque réplicat. Ces effets mesurés sont analysés à l'aide d'un modèle des risques proportionnels de Cox pour des effets mixtes.

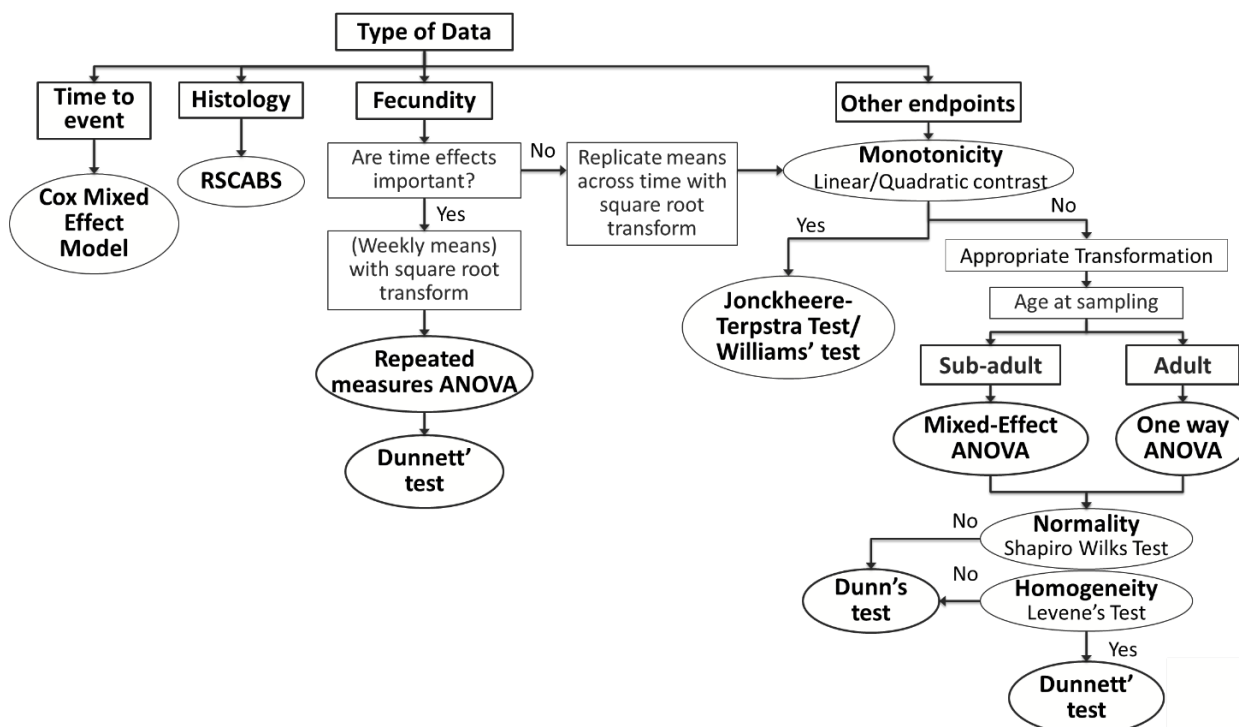
Les données biologiques relatives aux adultes prélevés ne sont mesurées qu'une fois par réplicat ; en effet, il y a un poisson XX et un poisson XY par aquarium réplicat. Il est donc recommandé de procéder à une ANOVA à un critère sur les moyennes des réplicats. Si les hypothèses de l'ANOVA (normalité et homogénéité des variances telles qu'évaluées sur les résidus de l'ANOVA par le test de Shapiro-Wilk et le test de Levene, respectivement) sont vérifiées, les contrastes de Dunnett doivent être utilisés pour déterminer les traitements qui diffèrent du témoin. En revanche, si les hypothèses de l'ANOVA ne sont pas vérifiées, un test de Dunn doit être pratiqué afin de déterminer quels sont les traitements qui diffèrent du témoin. Une procédure similaire est recommandée pour les données qui prennent la forme de pourcentages (fertilité, éclosion et survie). Cependant, la survie des couples reproducteurs des F0 et F1, qui

comprend une mesure par niveau de traitement, peut être analysée par le test de tendance « step-down » de Cochran-Armitage.

Les données biologiques de tous les prélèvements subadultes comportent 1 à 8 mesures par réplicat, ce qui signifie qu'il peut y avoir un nombre variable d'individus contribuant à la moyenne du réplicat pour chaque sexe génotypique. Il est donc recommandé d'utiliser un modèle d'ANOVA à effets mixtes, suivi du test des contrastes de Dunnett, si les hypothèses de normalité et d'homogénéité des variances sont vérifiées (sur les résidus de l'ANOVA à effets mixtes). Si elles ne sont pas vérifiées, un test de Dunn doit être pratiqué afin de déterminer quels sont les traitements qui diffèrent du témoin.

Bibliographie:

- 1) OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OCDE, Paris.
- 2) Green J W, Springer T A, Holbech H (2018) Statistical Analysis of Ecotoxicity Studies, Wiley, New York.
- 3) Swintek J (2020) Package 'StatCharrms'. Available from <https://cran.r-project.org/src/contrib/Archive/StatCharrms/>
- 4) Hocking R R (1985) The Analysis of Linear Models, Brooks/Cole, Monterey.
- 5) Hochberg Y and Tamhane A C (1987) Multiple comparison procedures Probability and mathematical statistics. Wiley-Interscience, New York.



**Figure 1.** Logigramme pour les procédures statistiques recommandées pour l'analyse de données de l'essai MEOGRT. D'autres méthodes statistiques peuvent être utilisées après consultation avec un statisticien et les autorités réglementaires.

**Figure 2.** Logigramme des procédures statistiques recommandées pour l'analyse des données du test MEOGRT.

Type of data	Type de donnée
Fecundity	Fécondité
Time to event	Délai avant événement
Histology	Histologie
Other endpoints	Autres effets mesurés
Cox Mixed EffectModel	Modèle à effets mixtes de Cox
RSCABS	RSCABS
Pass Test for Monotonicity	Test de monotonie positif
ANOVA on replicate means using square root transform	ANOVA sur les moyennes des réplicats après transformation racine carrée
Dunnett contrasts	Contrastes de Dunnett
Jonckheere-Terpstra on replicate	Jonckheere-Terpstra sur les réplicats
One-way Anova with a priori transforms	ANOVA à un critère avec transformations <i>a priori</i>
Adult	Adulte
Age at sampling	Âge lors du prélèvement
Subadult	Subadulte
Mixed effect model with a priori transforms	Modèle à effets mixtes avec transformations <i>a priori</i>
Meets normality and homogeneity assumptions	Hypothèses de normalité et d'homogénéité vérifiées
Dunn's test	Test de Dunn
Dunnett contrasts	Contrastes de Dunnett
Yes	Oui
No	Non



**Souches utilisées précédemment dans des études réussies de MEOGRT**

- NIES (Watanabe et al., 2017)
  - Cette souche est disponible auprès de l'organisme suivant:  
National Institute for Environmental Studies  
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki, 305-8506, Japan
- NIES-Duluth souche hybride (Flynn et al., 2018)
- La souche utilisée par Aquatic Bio Systems (Mihaich et al., 2019)

**Bibliographie**

- 1) Watanabe H, Horie F, Takanobu H, Koshio M, Flynn K, Iguchi T, Tatarazako N. (2017) Medaka Extended One-Generation Reproduction Test Evaluating 4-Nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36: 3254-3266.
- 2) Flynn K, Lothenbach D, Whiteman F, Hammermeister D, Swintek J, Etterson M, Johnson R. (2018) The Effects of Continuous Diazinon Exposure on Growth and Reproduction in Japanese Medaka Using a Modified Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 162: 348-445.
- 3) Mihaich E, Capdevielle M, Urbach-Ross D, Gallagher S, Wolf J. (2019) Medaka (*Oryzias latipes*) Multigeneration Test with Triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38: 1770-1783.