



Conseil de  
l'Union européenne

Bruxelles, le 25 février 2019  
(OR. en)

6800/19  
ADD 2

COMPET 206  
ENV 212  
CHIMIE 36  
MI 195  
ENT 53  
SAN 104  
CONSOM 77  
EMPL 121  
SOC 153

#### NOTE DE TRANSMISSION

---

Origine:	Commission européenne
Date de réception:	22 février 2019
Destinataire:	Secrétariat général du Conseil
N° doc. Cion:	Annexe du D060575/02
Objet:	Annexe du RÈGLEMENT (UE) .../... DE LA COMMISSION du XXX modifiant, aux fins de son adaptation au progrès technique, l'annexe du règlement (CE) n° 440/2008 établissant des méthodes d'essai conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH)

---

Les délégations trouveront ci-joint le document D060575/02 - Annexe.

---

p.j.: D060575/02 - Annexe

## **B.71 ESSAIS DE SENSIBILISATION CUTANÉE *IN VITRO* PORTANT SUR L'ÉVÉNEMENT CLÉ RELATIF À L'ACTIVATION DES CELLULES DENDRITIQUES DANS LA VOIE TOXICOLOGIQUE IMPLIQUÉE DANS LES EFFETS INDÉSIRABLES (AOP) DE SENSIBILISATION CUTANÉE**

### **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

#### **Méthode d'essai fondée sur l'événement clé relatif à l'activation des cellules dendritiques**

1. Un sensibilisant cutané est une substance qui provoque une réponse allergique suite à un contact avec la peau, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies (SGH) (1) et du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (le «règlement CLP»)¹. Les principales phases du processus biologique de sensibilisation cutanée font l'objet d'un consensus général. Dans le cadre du programme de l'OCDE sur les AOP (2), les connaissances dont on dispose sur les mécanismes chimiques et biologiques associés à la sensibilisation cutanée ont été résumées sous la forme d'un AOP (Adverse Outcome Pathway) ou voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables, allant de l'événement moléculaire initiateur jusqu'aux effets indésirables sur la santé du type dermatite de contact allergique, en passant par les étapes intermédiaires. Dans le cas présent, l'événement moléculaire initiateur (le premier événement clé) est l'établissement d'une liaison covalente entre des substances chimiques électrophiles et les centres nucléophiles des protéines de la peau. Le deuxième événement clé sur cet AOP se déroule dans les kératinocytes et comprend des réponses inflammatoires et des changements d'expression génique, liés à des voies de signalisation cellulaire spécifiques telles que les voies dépendant de l'élément de réponse antioxydant/électrophile (ARE, Antioxidant Response Element). Le troisième événement clé est l'activation des cellules dendritiques (DC), habituellement évaluée d'après l'expression de marqueurs de surface spécifiques de la cellule, les chimiokines et les cytokines. Le quatrième événement clé est la prolifération et l'activation des

---

¹ Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

lymphocytes T, évaluée indirectement par l'essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques (ELGL) chez la souris (3).

2. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice (LD) 442E (2017) de l'OCDE. Elle décrit les essais *in vitro* portant sur les mécanismes de l'événement clé relatif à l'activation des cellules dendritiques dans l'AOP de sensibilisation cutanée (2). La méthode d'essai comprend des essais utilisés pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés, selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP.

Les essais décrits dans la présente méthode d'essai sont les suivants:

- test d'activation de la lignée cellulaire humaine (h-CLAT),
  - test d'activation de la lignée cellulaire U937 (U-SENS™)  
essai par gène rapporteur de l'interleukine 8 (essai IL-8 Luc)
3. Les essais décrits dans la présente méthode d'essai et dans la ligne directrice correspondante de l'OCDE peuvent différer sur les plans de la procédure employée pour générer les données et des résultats mesurés, mais ils peuvent s'utiliser indifféremment pour répondre aux exigences des pays en matière de résultats d'essais portant sur l'événement clé relatif à l'activation des cellules dendritiques dans l'AOP de sensibilisation cutanée, tout en bénéficiant de l'acceptation mutuelle des données de l'OCDE.

#### **Fondements et principes des essais inclus dans la méthode d'essai fondée sur les événements clés**

4. Traditionnellement, l'évaluation de la sensibilisation cutanée a fait appel à l'expérimentation animale. Les méthodes classiques qui utilisent un cobaye – le test de maximisation chez le cobaye (GPMT) de Magnusson et Kligman et le test de Buehler, également chez le cobaye (méthode d'essai B.6) (4) – portent sur les phases d'induction et d'élicitation de la sensibilisation cutanée. Les essais chez la souris – l'ELGL (méthode d'essai B.42) (3) et ses deux variantes n'utilisant pas d'isotopes radioactifs, l'ELGL: DA (méthode d'essai B.50) (5) et l'ELGL: BrdU-ELISA (méthode d'essai B.51) (6) – portant tous trois sur la réponse à l'induction exclusivement, se sont également imposés, car ils présentent l'avantage, par rapport aux tests sur le cobaye, de préserver davantage le bien-être animal et de fournir une mesure objective de la phase d'induction de la sensibilisation cutanée.
5. Récemment, des méthodes d'essai de type mécanistique *in chemico* ou *in vivo* portant sur le premier événement clé de l'AOP de sensibilisation cutanée [méthode d'essai B.59: essai de liaison directe sur la réactivité peptidique (DPRA)] (7) ou sur le deuxième événement

clé de l'AOP de sensibilisation cutanée (méthode d'essai B.60: essai ARE-Nrf2 luciférase) (8) ont été adoptées pour contribuer à l'évaluation du potentiel de sensibilisation des produits chimiques.

6. Les essais décrits dans la présente méthode d'essai permettent de quantifier, au choix, soit les variations d'expression de marqueurs de surface associés au processus d'activation des monocytes et des DC suite à l'exposition à un sensibilisant (CD54 et CD86, par exemple), soit les changements d'expression de l'IL-8, une cytokine associée à l'activation des DC. Il a été signalé que les sensibilisants cutanés induisent l'expression de marqueurs membranaires associés à l'activation des DC (2) tels que CD40, CD54, CD80, CD83 et CD86, induisent aussi des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ , ainsi que plusieurs chimiokines parmi lesquelles IL-8 (CXCL8) et CCL3 (9) (10) (11) (12).
7. Cependant, l'activation des DC n'est qu'un des événements clés de l'AOP sensibilisation cutanée (2) (13), les informations fournies par les essais mesurant uniquement les marqueurs de l'activation des DC peuvent ne pas suffire à elles seules pour conclure à l'absence de pouvoir de sensibilisation cutanée des produits chimiques. Par conséquent, les données obtenues avec les essais décrits dans la présente LD peuvent apporter une aide à l'identification des sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH de l'ONU/CLP) et des non-sensibilisants, dans le cadre d'une approche intégrée (IATA), en combinant ces données à d'autres informations complémentaires provenant par exemple d'essais *in vitro* portant sur d'autres phases de l'AOP sensibilisation cutanée, ainsi que de méthodes non expérimentales telles que la prévision à partir de données croisées (*read-across*) relatives à des produits chimiques similaires (13). On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des données obtenues avec ces essais suivant des approches définies, c'est-à-dire des approches normalisées au regard des sources d'information et des procédures d'analyse des données à des fins de prédictions (13). Ces données peuvent constituer des éléments utiles dans le cadre d'une démarche IATA.
8. Les essais décrits dans cette méthode d'essai ne peuvent pas être utilisés seuls, ni pour le classement des sensibilisants cutanés dans les sous-catégories 1A et 1B du SGH de l'ONU/CLP par les autorités chargées d'appliquer ces deux sous-catégories optionnelles, ni pour prédire la puissance de sensibilisation dans le cadre d'évaluations de sécurité. Cependant, en fonction du cadre réglementaire applicable, des résultats positifs avec ces méthodes peuvent être considérés comme suffisants à eux seuls pour classer un produit chimique dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU/CLP.

9. Dans la présente méthode d'essai, le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé<sup>1</sup> et ne fait pas référence à l'applicabilité des essais pour tester les substances mono-constituants, les substances multi-constituants ou les mélanges. On dispose actuellement d'informations limitées sur l'applicabilité des essais à des substances multi-constituants ou à des mélanges (14) (15). Les essais sont néanmoins techniquement applicables aux essais de substances multi-constituants et de mélanges. Toutefois, avant d'appliquer la présente méthode d'essai à un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si et, dans l'affirmative, pourquoi les résultats peuvent être acceptables dans le cadre réglementaire imposé<sup>2</sup>. Cette vérification n'est pas nécessaire si l'essai du mélange répond à une exigence réglementaire. De plus, en cas d'essai portant sur des substances multi-constituants ou des mélanges, il convient de tenir compte de l'interférence possible de la cytotoxicité des constituants avec les réponses observées.

---

<sup>1</sup> En juin 2013, la Réunion conjointe de l'OCDE est convenue que, dans la mesure du possible, le terme «substance chimique d'essai» devrait être employé de façon plus cohérente pour désigner ce qui est soumis à l'essai dans les lignes directrices nouvelles ou révisées de l'OCDE.

<sup>2</sup> Ce libellé a été proposé et approuvé lors de la réunion EPOC (WNT) d'avril 2014

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) Nations Unies (2015). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). Sixième édition révisée. New York & Genève: Publications des Nations unies. ISBN: 978-92-1-117087-0. Disponible à l'adresse suivante: [https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev06/06files\\_e.html](https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_e.html).
- (2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Série sur les essais et évaluations N° 168. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=E NV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En).
- (3) Chapitre B.42 de la présente annexe: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques. Chapitre B.6 de la présente annexe: sensibilisation cutanée.
- (4) Chapitre B.50 de la présente annexe: sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatique: DA.
- (5) Chapitre B.51 de la présente annexe: essai de sensibilisation cutanée: essai de stimulation locale des ganglions lymphatiques: BrdU-ELISA.
- (6) Chapitre B.59 de la présente annexe: sensibilisation cutanée in chemico: essai de liaison directe sur la réactivité peptidique (DPRA).
- (7) Chapitre B.60 de la présente annexe: sensibilisation cutanée in vitro: méthode d'essai ARE-Nrf2 Luciferase.
- (8) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- (9) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J Exp Med* 180:1841-7.
- (10) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-8.
- (11) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation

of dendritic cells by two representative haptens, NiCl<sub>2</sub> and DNCB. *J Invest Dermatol* 120:390-8.

- (12) OCDE (2016). Série sur les essais et évaluations N° 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. [ENV/JM/HA\(2016\)29](#). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: <https://community.oecd.org/community/iatass>.
- (13) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (14) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

## Appendice 1

### **SENSIBILISATION CUTANÉE *IN VITRO*: TEST D'ACTIVATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE HUMAINE (h-CLAT)**

#### **REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES**

1. L'essai h-CLAT permet de quantifier les variations d'expression des marqueurs de surface cellulaires associés au processus d'activation des monocytes et des DC (CD86 et CD54), dans la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine THP-1, à la suite de l'exposition à des sensibilisants (1) (2). Le niveau d'expression mesuré pour les marqueurs de surface cellulaires CD86 et CD54 est utilisé pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés.
2. L'essai h-CLAT a fait l'objet d'une étude de validation coordonnée du Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM), suivie d'un examen indépendant par des pairs sous la conduite du Comité scientifique consultatif (ESAC) de EURL ECVAM. Après analyse des données disponibles et sur avis des organismes de régulation et des parties prenantes, l'EURL ECVAM a recommandé l'utilisation de la méthode h-CLAT (3) dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants à des fins de classification et d'étiquetage des dangers. On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des données h-CLAT combinées à d'autres sources d'information (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).
3. Il a été démontré que l'essai h-CLAT est transférable à des laboratoires expérimentés dans les techniques de cultures cellulaires et de l'analyse par cytométrie en flux. Le niveau de reproductibilité attendu des prédictions obtenues par l'essai est de l'ordre de 80 % intra-laboratoire et 80 % inter-laboratoires (3) (12). L'étude de validation (13) et d'autres études publiées (14) ont permis de conclure que, par rapport aux résultats obtenus par la méthode ELGL, la précision de distinction entre sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH/CLP) et non-sensibilisants est de 85 % (N = 142), avec une sensibilité de 93 % (94/101) et une spécificité de 66 % (27/41) (d'après une nouvelle analyse de l'EURL ECVAM (12) prenant en compte toutes les données existantes mais excluant les résultats négatifs obtenus avec un coefficient de partage octanol-eau (log K<sub>ow</sub>) supérieur à 3,5 tel que décrit au paragraphe 4). Il est probable que les faux-négatifs dans les prédictions effectuées avec l'essai h-CLAT concernent davantage des produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau faible à modérée (c'est-à-dire sous-catégorie 1B du SGH/CLP) que des produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau élevée (c'est-à-dire sous-catégorie 1A du SGH/CLP) (4) (13) (15). L'ensemble de ces données montre

l'utilité de l'essai h-CLAT comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée. Cependant, les valeurs relatives à la précision de l'essai h-CLAT utilisé seul n'ont qu'un caractère indicatif, car cet essai doit être combiné à d'autres sources d'information dans le contexte d'une démarche IATA, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 7 et 8 de l'Introduction Générale. En outre, dans l'évaluation des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'être humain.

4. Les données actuellement disponibles montrent que la méthode h-CLAT est applicable à des produits chimiques couvrant divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes réactionnels, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études *in vivo*) et propriétés physico-chimiques (3) (14) (15). La méthode h-CLAT est applicable aux produits chimiques solubles ou formant une dispersion stable (colloïde ou suspension dans laquelle le produit chimique d'essai ne se dépose pas et ne se sépare pas du solvant/véhicule en formant plusieurs phases) dans un solvant/véhicule adapté (voir paragraphe 14). Les résultats pour les produits chimiques présentant un log Koe supérieur à 3.5 sont souvent des faux négatifs (14). Par conséquent, les résultats négatifs associés à des produits chimiques présentant un log Koe supérieur égal à 3.5 ne doivent pas être considérés. Cependant les résultats positifs associés à des produits chimiques présentant un log Koe supérieur égal à 3.5 peuvent quand même être utilisés pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme sensibilisant cutané. De plus, en raison des capacités métaboliques limitées de la lignée cellulaire utilisée (16) ainsi que des conditions expérimentales, les pro-haptènes (substances nécessitant une activation enzymatique, par exemple via des enzymes P450) et les pré-haptènes (substances activées par oxydation), en particulier ceux dont l'oxydation est lente, peuvent eux aussi donner des résultats négatifs avec le h-CLAT (15). Il est possible de tester des produits chimiques fluorescents avec le h-CLAT (17), néanmoins les produits fortement fluorescents qui émettent à la même longueur d'onde que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou que l'iodure de propidium (IP) causent une interférence avec la détection par cytométrie en flux. Ces produits ne peuvent donc pas être adéquatement analysés avec des anticorps conjugués au FITC ou à l'IP. Dans ce cas, on peut recourir respectivement au marquage des anticorps par d'autres fluorochromes, ou à d'autres marqueurs de cytotoxicité, à condition qu'il soit démontré, par exemple en testant les substances d'épreuve de compétence citées à l'appendice 1-2, que ces techniques génèrent des résultats similaires aux anticorps marqués au FITC (voir paragraphe 24) ou à l'IP (voir paragraphe 18). À la lumière de ce qui précède, les résultats négatifs devront être interprétés dans le contexte des limites indiquées et combinés avec d'autres sources d'information dans le cadre d'une démarche IATA. S'il est démontré que la méthode h-CLAT n'est pas applicable à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques d'essai, cette méthode ne doit pas leur être appliquée.

5. Comme indiqué ci-dessus, la méthode h-CLAT aide à distinguer les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants. Cependant, utilisée dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, elle peut aussi contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation (4) (5) (9). Des travaux complémentaires, s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer de quelle façon les résultats du h-CLAT pourraient venir à l'appui de ce type d'évaluation
6. Les définitions sont données à l'appendice 1.1.

### PRINCIPE DE L'ESSAI

7. La méthode *in vitro* h-CLAT permet de quantifier les variations d'expression de marqueurs de surface (CD86 et CD54) des cellules de la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine THP-1, après une exposition de 24 heures à un produit chimique d'essai. Ces molécules de surface sont des marqueurs typiques de l'activation des monocytes THP-1 et peuvent imiter l'activation des DC, étape critique dans l'amorçage des lymphocytes T. La variation d'expression des marqueurs de surface est mesurée par cytométrie en flux après coloration cellulaire avec des anticorps marqués par fluorochrome. La cytotoxicité est mesurée en parallèle pour savoir si l'activation de l'expression des marqueurs de surface a lieu à des concentrations inférieures au niveau de cytotoxicité. L'intensité relative de fluorescence des marqueurs de surface, comparée à celle du témoin de solvant/véhicule, est calculée et utilisée dans un modèle prédictif (voir paragraphe 26), pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants.

### DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

8. Avant d'utiliser en routine l'essai décrit dans le présent appendice à la méthode d'essai B.71, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux dix substances d'épreuve listées à l'appendice 1.2. En outre, les utilisateurs de cet essai devront conserver une base de données historiques issues des contrôles de réactivité (voir paragraphe 11) et obtenues avec le témoin positif et le témoin de solvant/véhicule (voir paragraphes 20-22), et devront utiliser ces données pour confirmer que la reproductibilité de l'essai dans le temps au sein de leur laboratoire.

### PROCÉDURE

9. Le présent essai est basé sur le protocole h-CLAT du service de base de données sur les méthodes alternatives à l'expérimentation animale (DB-ALM, *DataBase service on Alternative Methods to animal experimentation* n° 158) (18), qui est celui qui a été utilisé pour l'étude de validation coordonnée par l'EURL ECVAM. Il est recommandé d'utiliser ce

protocole lors de la mise en œuvre et de l'utilisation de la méthode h-CLAT au laboratoire. On trouvera dans ce qui suit une description des principaux éléments et modes opératoires de la méthode h-CLAT, qui comprend deux étapes: un *essai de détermination de la dose* et la *mesure de l'expression de CD86/CD54*.

### Préparation des cellules

10. La méthode h-CLAT fait appel à la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine, THP-1. Il est recommandé d'acquérir les cellules (TIB-202™) auprès d'une banque de cellules reconnue, par exemple l'*American Type Culture Collection*.
11. Les cellules THP-1 sont cultivées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5 % CO<sub>2</sub>, dans un milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10 % de sérum bovin fœtal (SBF), 0.05 mM de 2-mercaptoéthanol, 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Il est possible d'éviter l'ajout de pénicilline et de streptomycine dans le milieu. Cependant, dans ce cas, les utilisateurs devront vérifier que l'absence d'antibiotiques dans le milieu n'a aucun effet sur les résultats, par exemple en testant les substances d'épreuve indiquées à l'appendice 1-2. Quoi qu'il en soit, dans le but de minimiser le risque de contamination, les bonnes pratiques de culture cellulaire seront suivies, indépendamment de la présence ou non d'antibiotiques dans le milieu de culture cellulaire. Les cellules THP-1 sont repiquées régulièrement tous les 2 ou 3 jours, à une densité comprise entre 0.1 et 0.2 x 10<sup>6</sup> cellules/ml, et doivent être maintenues à une densité comprise entre 0.1 et 1 x 10<sup>6</sup> cellules/ml. Avant utilisation pour l'essai, les cellules doivent être qualifiées par un contrôle de réactivité. Ce contrôle doit être réalisé deux semaines après la décongélation, avec pour témoins positifs le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) (N° CAS 97-00-7, pureté ≥ 99 %) et le sulfate de nickel (NiSO<sub>4</sub>) (N° CAS 10101-97-0, pureté ≥ 99 %) et pour témoin négatif l'acide lactique (AL) (N° CAS 50-21-5, pureté ≥ 85 %). Le DNCB et le NiSO<sub>4</sub> doivent tous deux générer des réponses positives à la fois pour les marqueurs de surface cellulaires CD86 et CD54. L'acide lactique doit générer une réponse négative à la fois pour les marqueurs de surface cellulaires CD86 et CD54. Seules les cellules ayant réussi le contrôle de réactivité sont utilisées pour l'essai. Les cellules peuvent être repiquées jusqu'à deux mois après décongélation, sans dépasser 30 repiquages. Le contrôle de réactivité doit être conduit selon les procédures décrites aux paragraphes 20-24.
12. . Pour l'essai, les cellules THP-1 sontensemencées à une densité de 0,1 x 10<sup>6</sup> cellules/ml ou de 0,2 x 10<sup>6</sup> cellules/ml, et précultivées dans des flacons de culture pendant 72 h ou 48 h, respectivement. Il est important que la densité cellulaire dans le flacon de culture immédiatement après la période de pré-culture soit autant que possible la même dans chaque expérimentation (en suivant l'une des deux conditions de pré-culture ci-dessus). En effet, la densité cellulaire dans le flacon de culture immédiatement après la pré-culture peut

influencer l'expression de CD86/CD54 induite par des allergènes (19). Le jour de l'essai, les cellules sont récoltées depuis le flacon de culture et suspendues à une densité de  $2 \times 10^6$  cellules/ml dans un milieu frais. Les cellules sont ensuiteensemencées dans une plaque microtitre 24 puits à fond plat, avec 500  $\mu$ l ( $1 \times 10^6$  cellules/puits), ou dans une plaque 96 puits à fond plat, avec 80  $\mu$ l ( $1,6 \times 10^5$  cellules/puits).

### Essai de détermination de la dose

13. Un essai de détermination de la dose est mené pour établir la valeur CV75, à savoir la concentration de produit chimique d'essai provoquant une viabilité cellulaire (CV) de 75 % comparé au témoin de solvant/véhicule. Cette valeur CV75 est utilisée pour déterminer la concentration de produits chimiques d'essai à utiliser lors de la mesure d'expression de CD86/CD54 (voir paragraphes 20-24).

### *Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins*

14. Les produits chimiques d'essai et les substances témoins sont préparés le jour de l'essai. Dans la méthode h-CLAT, les produits chimiques d'essai sont dissous ou dispersés de façon stable (voir paragraphe 4), en choisissant de préférence comme solvant/véhicule une solution saline ou le milieu, ou, en deuxième option, dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, pureté  $\geq 99$  %) si le produit chimique d'essai n'est pas soluble ou ne forme pas une dispersion stable dans les deux solvants/véhicules précédents. Les concentrations finales sont de 100 mg/mL (solution saline ou milieu) ou de 500 mg/mL (DMSO). Il est possible d'utiliser d'autres solvants/véhicules que ceux indiqués ci-dessus, à condition que ce choix soit suffisamment étayé sur le plan scientifique. La stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant/véhicule final doit être prise en compte.
15. À partir des solutions mères de produits chimiques d'essai, à 100 mg/ml (solution saline ou milieu) ou à 500 mg/ml (DMSO), les dilutions suivantes sont effectuées:
  - si le solvant/véhicule est la solution saline ou le milieu: huit solutions mères (huit concentrations) sont préparées par une série de dilutions de facteur 2 en utilisant le solvant/véhicule pertinent. Ces solutions mères sont ensuite diluées à nouveau par un facteur de 50 dans le milieu de culture (solutions de travail). Si la concentration finale maximale de 1 000  $\mu$ g/ml dans la plaque n'est pas toxique, la concentration maximale doit être à nouveau déterminée en réalisant un autre essai de cytotoxicité. La concentration finale dans la plaque ne doit pas dépasser 5 000  $\mu$ g/ml pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable dans la solution saline ou le milieu;
  - si le solvant/véhicule est le DMSO: huit solutions mères (huit concentrations) sont préparées par une série de dilutions de facteur 2 en utilisant le solvant/véhicule pertinent. Ces solutions mères sont ensuite diluées à nouveau par un facteur de 250 dans le milieu de

culture (solutions de travail). La concentration finale dans la plaque ne doit pas dépasser 1000 µg/ml, même si cette concentration est non-toxique.

Les solutions de travail sont enfin utilisées pour l'exposition, en ajoutant le même volume de solution de travail au volume de cellules THP-1 en suspension dans la plaque (voir aussi paragraphe 17), pour parvenir à une dilution supplémentaire de facteur 2 (en général, les concentrations finales dans la plaque vont de 7,81 à 1 000 µg/ml).

16. Le témoin de solvant/véhicule utilisé pour la méthode h-CLAT est le milieu de culture (pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable (voir paragraphe 4) dans le milieu ou dans la solution saline), ou le DMSO (pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable dans le DMSO). Ce témoin est testé à une concentration finale unique de 0,2 % dans la plaque. On effectue la même dilution que pour les solutions de travail, comme décrit au paragraphe 15.

#### *Application des produits chimiques d'essai et des témoins*

17. Le milieu de culture ou les solutions de travail décrits aux paragraphes 15 et 16 sont mélangés en proportion 1:1 (v/v) avec les suspensions de cellules préparées dans la plaque microtitre 24 ou 96 puits à fond plat (voir paragraphe 12). Les plaques traitées sont ensuite placées en incubation pendant  $24 \pm 0,5$  heures à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Des précautions doivent être prises contre l'évaporation des produits chimiques d'essai volatiles et pour éviter toute contamination croisée entre puits par les produits chimiques d'essai (en scellant la plaque avant incubation avec les produits chimiques d'essai, par exemple) (20).

#### *Coloration à l'iodure de propidium (IP)*

18. Après  $24 \pm 0,5$  heures d'exposition, les cellules sont transférées dans des tubes à essai et collectées par centrifugation. Les surnageants sont éliminés et le culot cellulaire est suspendu dans 200 µl (plaque 96 puits) ou 600 µL (plaque 24 puits) de tampon phosphate salin contenant 0,1 % d'albumine de sérum bovin (tampon de coloration). On transfère 200 µl de suspension de cellules dans une plaque microtitre 96 puits à fond rond (échantillons issus de la plaque 96 puits) ou dans un microtube (échantillons issus de la plaque 24 puits), puis les cellules sont rincées deux fois dans 200 µl (96 puits) ou 600 µl (24 puits) de tampon de coloration. Pour finir, les cellules sont remises en suspension dans le tampon de coloration (400 µl, par exemple) et on ajoute une solution d'IP (20 µl, par exemple) (pour obtenir, par exemple, une concentration finale d'IP de 0,625 µg/ml). D'autres marqueurs de cytotoxicité tels que la 7-aminoactinomycine D (7-AAD) ou le bleu de Trypan, entre autres, peuvent être utilisés comme colorants s'il est prouvé qu'ils génèrent des résultats comparables à l'IP, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice 1-2.

#### *Mesure de cytotoxicité par cytométrie en flux et estimation de la valeur CV75*

19. Le niveau de fixation de l'IP est analysé par cytométrie en flux sur le canal FL-3. Au total, 10 000 cellules vivantes (IP-négatives) sont analysées. La viabilité cellulaire est calculée par le programme d'analyse du cytomètre suivant l'équation ci-après. Si la viabilité cellulaire est faible, il convient d'analyser jusqu'à 30 000 cellules, y compris des cellules mortes. Une autre option est d'acquérir les données pendant une minute après le début de l'analyse.

$$\text{Viabilité cellulaire} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{\text{Nombre total de cellules analysées}} \times 100$$

La valeur CV75 (voir paragraphe 13), soit la concentration provoquant 25 % de cytotoxicité et 75 % de survie des cellules THP-1, est calculée par interpolation log-linéaire des données, comme suit:

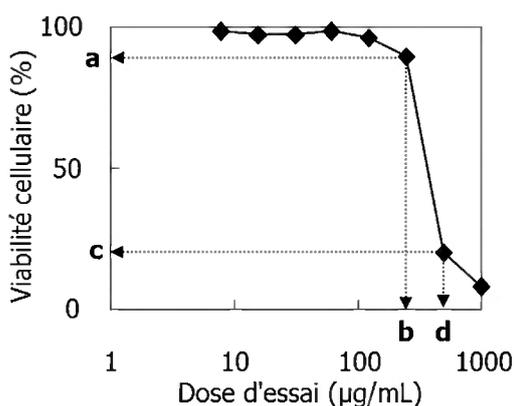
$$\text{Log CV75} = \frac{(75-c) \times \text{Log}(b) - (75-a) \times \text{Log}(d)}{a-c}$$

Où:

a est la valeur minimale de viabilité cellulaire supérieure à 75 %

c est la valeur maximale de viabilité cellulaire inférieure à 75 %

b et d sont les concentrations provoquant les valeurs de viabilité cellulaire a et c, respectivement



D'autres approches peuvent être utilisées pour calculer la valeur CV75 à condition qu'il soit démontré que cela n'a pas d'impact sur les résultats (par exemple en testant les substances d'épreuve).

## Mesure de l'expression de CD86/CD54

### *Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins*

20. Le solvant/véhicule approprié (solution saline, milieu ou DMSO, voir paragraphe 14) est utilisé pour dissoudre les produits chimiques d'essai ou pour créer une dispersion stable. Les produits chimiques d'essai sont d'abord dilués jusqu'à une concentration correspondant à 100 fois (dans la solution saline ou le milieu) ou 500 fois (dans le DMSO) la valeur  $CV_{75} \times 1,2$  telle que déterminée dans l'*essai de détermination de la dose* (voir paragraphe 19). Si la valeur  $CV_{75}$  ne peut pas être établie (c'est-à-dire, si la cytotoxicité observée dans l'*essai de détermination de la dose* est insuffisante), il convient d'utiliser comme concentration de départ la concentration soluble ou en dispersion stable la plus élevée du produit chimique d'essai préparé avec chaque solvant/véhicule. On notera que la concentration finale dans la plaque microtitre ne doit pas dépasser 5 000  $\mu\text{g/ml}$  (dans la solution saline ou le milieu) ou 1 000  $\mu\text{g/ml}$  (dans le DMSO). Ensuite, des dilutions en série de facteur 1,2 sont réalisées avec le solvant/véhicule pertinent pour obtenir les solutions mères (huit concentrations allant de  $100 \times 1,2 \times CV_{75}$  à  $100 \times 0,335 \times CV_{75}$  (dans la solution saline ou le milieu) ou de  $500 \times 1,2 \times CV_{75}$  à  $500 \times 0,335 \times CV_{75}$  (pour le DMSO)) qui seront testées suivant la méthode h-CLAT (voir le protocole DB-ALM n° 158 pour un exemple de schéma de dosage). Les solutions mères sont ensuite diluées à nouveau par un facteur de 50 (solution saline ou milieu) ou 250 (DMSO) dans le milieu de culture (solutions de travail). Ces solutions de travail sont enfin utilisées pour l'exposition, après une dilution finale de facteur 2 dans la plaque microtitre. Si les résultats ne rentrent pas dans les critères d'acceptabilité pour la viabilité cellulaire décrits aux paragraphes 29 et 30, l'*essai de détermination de la dose* peut être répété pour déduire une valeur  $CV_{75}$  plus précise. Il convient de noter que seules des plaques 24 puits peuvent être utilisées pour la mesure de l'expression de CD86/CD54.
21. Le témoin de solvant/véhicule est préparé comme indiqué au paragraphe 16. Le témoin positif utilisé dans la méthode h-CLAT est le DNCB (voir paragraphe 11), dont des solutions mères sont préparées dans le DMSO et diluées comme pour les solutions mères au paragraphe 20. Le DNCB doit être utilisé comme témoin positif pour la *mesure de l'expression de CD86/CD54* à une concentration finale unique dans la plaque (en général 4,0  $\mu\text{g/ml}$ ). Pour obtenir une concentration de 4,0  $\mu\text{g/ml}$  de DNCB dans la plaque microtitre, une solution de base de 2 mg/ml de DNCB dans le DMSO est préparée puis diluée à nouveau par un facteur de 250 dans le milieu, jusqu'à obtenir une solution de travail à 8  $\mu\text{g/ml}$ . Il est aussi possible de prendre la valeur  $CV_{75}$  du DNCB, déterminée dans chaque installation d'essai, comme concentration du témoin positif. D'autres témoins positifs adaptés peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour en dériver des critères d'acceptabilité comparables pour les épreuves. Pour les témoins positifs, la concentration finale unique dans la plaque ne doit pas dépasser 5 000  $\mu\text{g/mL}$ .

(solution saline ou milieu) ou 1 000 µg/mL (DMSO). Les critères d'acceptabilité de l'épreuve sont identiques à ceux décrits pour les produits chimiques d'essai (voir paragraphe 29), sauf le dernier critère d'acceptabilité puisque le témoin positif est traité à une concentration unique.

#### *Application des produits chimiques d'essai et des témoins*

22. Une expérience par produit chimique d'essai et par substance témoin est nécessaire pour obtenir une prédiction. Chaque expérience consiste en au moins deux épreuves indépendantes visant à *mesurer l'expression de CD86/CD54* (voir paragraphes 26-28). Les épreuves indépendantes se déroulent des jours distincts, ou le même jour en respectant les conditions suivantes pour chaque épreuve: a) préparation de solutions mères et de travail fraîches, indépendantes, du produit chimique et des solutions d'anticorps, et b) utilisation de cellules récoltées en deux temps indépendants (provenant de flacons de culture différents); les cellules peuvent cependant être issues d'un même repiquage. Les solutions de travail des produits chimiques d'essai et des substances témoins (500 µl) sont mélangées à 500 µl de la suspension de cellules ( $1 \times 10^6$  cellules) suivant un ratio 1:1. Les cellules sont incubées pendant  $24 \pm 0,5$  heures comme décrit aux paragraphes 20 et 21. Pour chaque épreuve, un seul réplicat par concentration du produit chimique d'essai et de la substance témoin suffit, car la prédiction provient d'au moins deux épreuves indépendantes.

#### *Coloration cellulaire et analyse*

23. Après  $24 \pm 0,5$  heures d'exposition, les cellules sont transférées de la plaque 24 puits vers des tubes à essai et collectées par centrifugation, avant d'être lavées deux fois avec 1ml de tampon de coloration (si nécessaire, des étapes de lavage supplémentaires peuvent être faites). Après lavage, les cellules sont saturées avec 600 µl de solution de blocage (tampon de coloration contenant 0,01 % (m/v) de globuline (fraction Cohn II, III, humain: SIGMA, #G2388-10G)) et incubées à 4°C pendant 15 minutes. Après la saturation, les cellules sont réparties en trois aliquotes de 180 µL, dans une plaque 96 puits à fond rond ou dans un microtube.
24. Après centrifugation, les cellules sont colorées à 4°C pendant 30 minutes, avec 50 µl d'anticorps marqués au FITC: anti-CD86 ou anti-CD54, ou anticorps murins isotype IgG1. Les anticorps, décrits dans le protocole n° 158 (h-CLAT) de la base de données DB-ALM (18), sont dilués dans du tampon de coloration selon un ratio de 3:25 v/v [pour CD86 (BD-PharMingen, #555657; Clone: Fun-1)] ou 3:50 v/v [pour CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) et IgG1 (DAKO, #X0927)]. Ces ratios de dilution des anticorps ont été identifiés au moment de la mise au point de l'essai comme ceux présentant le meilleur rapport signal/bruit. L'expérience acquise lors de la mise au point de l'essai indique que l'intensité de la fluorescence des anticorps est généralement comparable d'un lot à un autre.

Cependant, les utilisateurs peuvent souhaiter procéder au titrage des anticorps dans leurs conditions de laboratoire, afin de déterminer la concentration la mieux adaptée. Des anticorps anti-CD86 et/ou anti-CD54 marqués par d'autres fluorochromes peuvent être utilisés s'il est prouvé qu'ils génèrent des résultats comparables aux anticorps marqués au FITC, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice 1.2. Il convient de noter qu'un changement de clone ou de fournisseur d'anticorps, comme décrit dans le protocole n° 158 (h-CLAT) de la base de données DB-ALM (18), peut avoir un impact sur les résultats. Après avoir été lavées deux fois ou plus dans 150 µl de tampon de coloration, les cellules sont remises en suspension dans du tampon de coloration (p.ex. 400 µl) et on ajoute la solution d'IP (p.ex. 20 µl, pour une concentration finale de 0,625 µg/ml) ou un autre marqueur de cytotoxicité (voir paragraphe 18). Le niveau d'expression de CD86 et CD54, ainsi que la viabilité cellulaire, sont analysés par cytométrie en flux.

## RÉSULTATS ET RAPPORT

### Évaluation des données

25. Le niveau d'expression de CD86 et CD54 est analysé par cytométrie en flux sur le canal FL-1. En fonction de la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (IMF, intensité moyenne de fluorescence), l'intensité relative de fluorescence (IRF) de CD86 et de CD54 pour les cellules témoins (ctrl) positives et pour les cellules exposées au produit chimique est calculée comme suit:

$$RFI = \frac{IMF \text{ cellules exposées au produit chimique} - IMF \text{ témoins isotypes exposés au produit chimique}}{IMF \text{ témoins exposés au solvant/véhicule} - IMF \text{ témoins isotypes exposés au solvant/véhicule}} \times 100$$

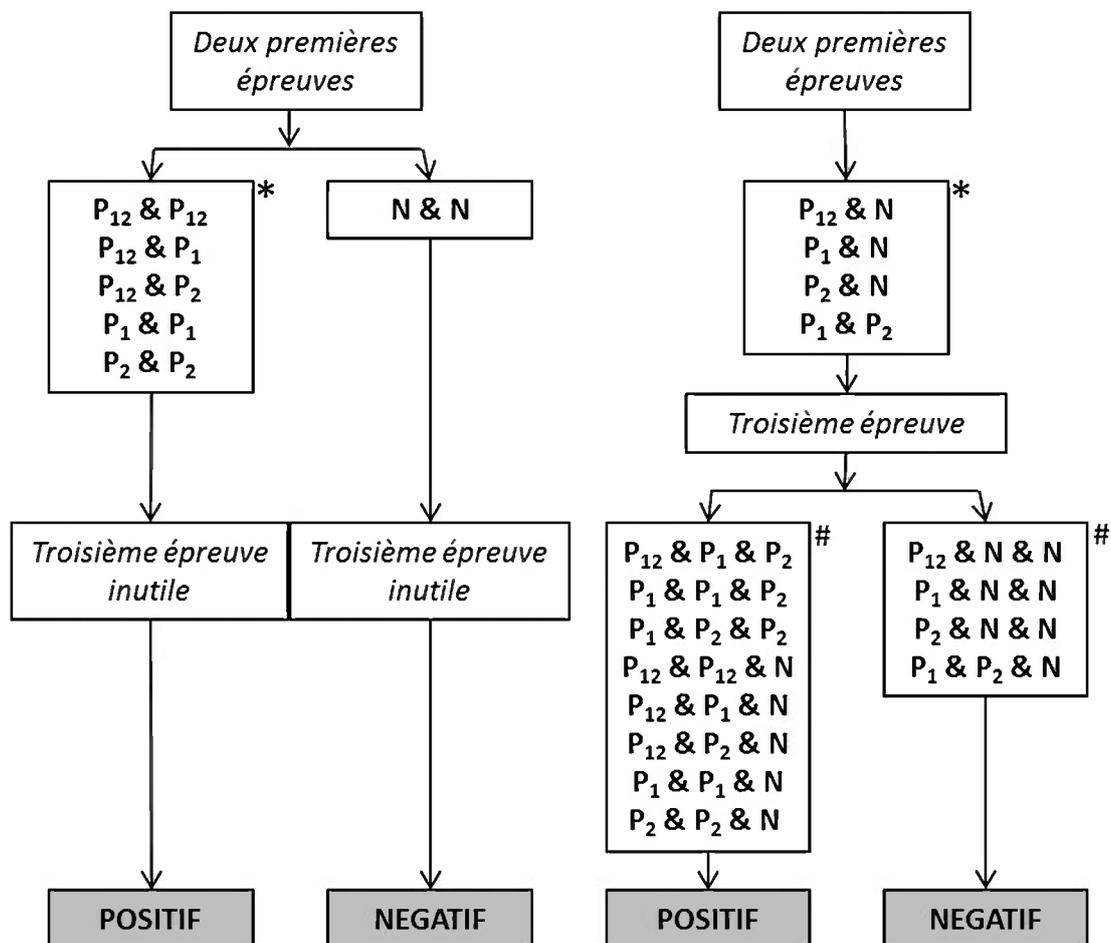
La viabilité cellulaire des cellules témoins isotypes, colorées avec les anticorps murins IgG1 (isotypes) est aussi calculée, suivant l'équation indiquée au paragraphe 19.

### Modèle prédictif

26. . Pour la *mesure de l'expression de CD86/CD54*, on teste chaque produit chimique d'essai dans au moins deux épreuves indépendantes pour en déduire une prédiction unique (POSITIVE ou NÉGATIVE). Une prédiction par h-CLAT est jugée POSITIVE si l'une au moins des conditions suivantes se réalise dans deux sur deux ou au moins deux sur trois épreuves indépendantes; dans le cas contraire, la prédiction est jugée NÉGATIVE (figure 1):
- IRF de CD86  $\geq$  150 % à toutes les concentrations testées (et viabilité cellulaire  $\geq$  50 %);
  - IRF de CD54  $\geq$  200 % à toutes les concentrations testées (et viabilité cellulaire  $\geq$  50 %).

27. En se basant sur les critères ci-dessus, si les deux premières épreuves sont toutes deux positives pour CD86 et/ou toutes deux positives pour CD54, la prédiction par h-CLAT est jugée POSITIVE et il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve. De même, si les deux premières épreuves sont toutes deux négatives pour les deux marqueurs, la prédiction par h-CLAT est jugée NÉGATIVE (compte tenu des dispositions prévues au paragraphe 30) et il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve. Cependant, si les deux premières épreuves ne sont pas concordantes pour l'un des marqueurs au moins (CD54 ou CD86), il est nécessaire de réaliser une troisième épreuve et la prédiction sera fondée sur le résultat obtenu dans la majorité des trois épreuves individuelles (c'est-à-dire 2 sur 3). À ce sujet, on notera que, si deux épreuves indépendantes sont menées et que l'une n'est positive que pour CD86 (ci-après P<sub>1</sub>) tandis que l'autre n'est positive que pour CD54 (ci-après P<sub>2</sub>), il est nécessaire de réaliser une troisième épreuve. Si la troisième épreuve est négative pour les deux marqueurs (ci-après N), la prédiction par h-CLAT est jugée NÉGATIVE. À l'inverse, si la troisième épreuve est positive pour l'un des marqueurs (P<sub>1</sub> ou P<sub>2</sub>) ou pour les deux marqueurs (ci-après P<sub>12</sub>), la prédiction par h-CLAT est jugée POSITIVE.

**Figure 1:** modèle prédictif utilisé dans l'essai h-CLAT. Une prédiction par h-CLAT doit être considérée dans le cadre d'une approche intégrée IATA et conformément aux dispositions des paragraphes 7 et 8 de l'Introduction Générale.



P<sub>1</sub>: épreuve positive pour CD86 seul; P<sub>2</sub>: épreuve positive pour CD54 seul; P<sub>12</sub>: épreuve positive pour CD86 et CD54; N: l'épreuve n'est positive ni pour CD86, ni pour CD54.

\*Les cases montrent les combinaisons pertinentes de résultats issus des deux premières épreuves, indépendamment de l'ordre d'obtention des résultats.

#Les cases montrent les combinaisons pertinentes de résultats issus des trois épreuves sur la base des résultats obtenus dans les deux premières épreuves (cases au-dessus), mais ne reflètent pas l'ordre d'obtention des résultats.

28. Éventuellement, pour les produits chimiques d'essai assortis d'une prédiction par h-CLAT POSITIVE, deux valeurs de concentration efficace (CE), CE150 pour CD86 et CE200 pour CD54, peuvent être déterminées (c'est-à-dire la concentration à laquelle les produits chimiques d'essai génèrent une IRF de 150 ou 200). Ces valeurs de CE pourraient contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation (9), dans le cadre d'une approche intégrée IATA (4) (5) (6) (7) (8). Elles sont calculées à l'aide des équations ci-dessous:

$$CE_{150} \text{ (pour CD86)} = B_{concentration} + [(150 - B_{IRF}) / (A_{IRF} - B_{IRF}) \times (A_{concentration} - B_{concentration})]$$

$$CE_{200} \text{ (pour CD54)} = B_{concentration} + [(200 - B_{IRF}) / (A_{IRF} - B_{IRF}) \times (A_{concentration} - B_{concentration})]$$

où

$A_{\text{concentration}}$  est la plus faible concentration en  $\mu\text{g/ml}$  générant une IRF  $> 150$  (CD86) ou 200 (CD54)

$B_{\text{concentration}}$  est la plus forte concentration en  $\mu\text{g/ml}$  générant une IRF  $< 150$  (CD86) ou 200 (CD54)

$A_{\text{IRF}}$  est l'IRF à la plus faible concentration générant une IRF  $> 150$  (CD86) ou 200 (CD54)

$B_{\text{IRF}}$  est l'IRF à la plus forte concentration générant une IRF  $< 150$  (CD86) ou 200 (CD54)

Afin de déterminer avec plus de précision les valeurs CE150 et CE200, trois épreuves indépendantes de *mesure de l'expression de CD86/CD54* peuvent être nécessaires. Les valeurs CE150 et CE200 finales sont alors définies comme la valeur médiane des CE calculées à partir des trois épreuves indépendantes. Si seules deux épreuves indépendantes sur trois satisfont aux critères de positivité (voir paragraphes 26-27), la valeur CE150 ou CE200 la plus élevée des deux est retenue.

### Critères d'acceptabilité

29. Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis lors de la mise en œuvre de la méthode h-CLAT (22) (27).

- les valeurs de viabilité cellulaire du témoin dans le milieu et du témoin de solvant/véhicule sont supérieures à 90 %.
- pour le témoin de solvant/véhicule, les IRF de CD86 et de CD54 ne dépassent pas les critères de positivité (CD86 IRF  $\geq 150$  % et CD54 IRF  $\geq 200$  %). Les valeurs d'IRF pour le témoin de solvant/véhicule sont calculées suivant la formule indiquée au paragraphe 25 (en remplaçant la mention «IMF du produit chimique» par «IMF du solvant/véhicule» et «IMF du solvant/véhicule» par «IMF du témoin (dans le milieu)»).
- pour les deux témoins (milieu et solvant/véhicule), les ratios IMF CD86/témoin isotype et IMF CD54/témoin isotype sont  $> 105$  % dans les deux cas.
- pour le témoin positif (DNCB), les IRF de CD86 et de CD54 satisfont aux critères de positivité (CD86 IRF  $\geq 150$  % et CD54 IRF  $\geq 200$  %), avec une viabilité cellulaire  $> 50$  %
- pour le produit chimique d'essai, la viabilité cellulaire est  $> 50$  % pour au moins quatre concentrations testées dans chaque épreuve.

30. Un résultat négatif n'est acceptable que pour les produits chimiques d'essai présentant une viabilité cellulaire inférieure à 90 % à la plus haute concentration testée (soit  $1,2 \times \text{CV75}$ , selon le schéma de dilutions en série décrit au paragraphe 20). Si la viabilité à  $1,2 \times \text{CV75}$  est égale ou supérieure à 90 %, le résultat négatif n'est pas pris en compte. Dans ce cas, il est recommandé d'essayer d'affiner le choix des doses en répétant la détermination de CV75. Il convient de noter que, si une concentration de 5 000  $\mu\text{g/ml}$  dans la solution saline (ou dans le milieu ou autres solvants/véhicules), une concentration de 1 000  $\mu\text{g/ml}$

dans le DMSO, ou la concentration soluble la plus élevée est utilisée comme concentration maximale d'essai pour un produit chimique, un résultat négatif est acceptable même en présence d'une viabilité cellulaire supérieure à 90 %.

### Rapport d'essai

31. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes.

#### *Produit chimique d'essai*

##### Substance mono-constituant

- identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;
- apparence physique, Log K<sub>ow</sub>, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques, selon les données disponibles;
- pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- concentration(s) testée(s);
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
- justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

##### Substance multi-constituants, UVCB ou mélange

- caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;
- apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
- masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude;
- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- concentration(s) testée(s);
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
- justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

#### *Témoins*

## Témoin positif

- identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;
- apparence physique, Log K<sub>ow</sub>, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
- pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- concentration(s) testée(s);
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
- référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.

## Témoin négatif et témoin de solvant/véhicule

- identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;
- pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
- apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des solvants/véhicules autres que ceux mentionnés dans la Ligne directrice sont utilisés, et selon les données disponibles;
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
- justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

*Conditions d'essai*

- nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;
- description de l'essai utilisé;
- lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et source (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple);
- type de cytométrie en flux utilisé (modèle, par exemple), en particulier paramétrage des instruments, globuline, anticorps et marqueur de cytotoxicité utilisés;

- procédure appliquée pour démontrer les compétences du laboratoire dans l'exécution de l'essai au moyen des substances d'épreuve de compétence et procédure appliquée pour démontrer la reproductibilité de l'essai dans le temps, par exemple données historiques des témoins et/ou des contrôles de réactivité.

#### *Critères d'acceptabilité de l'essai*

- viabilité cellulaire, valeurs IMF et IRF avec le témoin de solvant/véhicule comparées à la plage d'acceptabilité;
- viabilité cellulaire et valeurs IRF avec le témoin positif comparées à la plage d'acceptabilité;
- viabilité cellulaire de toutes les concentrations testées du produit chimique d'essai.

#### *Mode opératoire*

- nombre d'épreuves réalisées;
- concentration de produit chimique d'essai, application et moment d'exposition (si différent du moment recommandé)
- durée d'exposition (si différente de la durée recommandée);
- description des critères d'évaluation et de décision appliqués;
- description de toutes modifications apportées au mode opératoire.

#### *Résultats*

- tableau des données, y compris CV75 (s'il y a lieu), IMF géométrique, IRF, valeurs de viabilité cellulaire, valeurs CE150/CE200 (s'il y a lieu) pour chaque produit chimique testé et substance témoin dans chaque épreuve, et indication de la classification du produit chimique d'essai d'après le modèle prédictif;
- description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu.

#### *Discussion des résultats*

- discussion des résultats obtenus par la méthode h-CLAT;
- examen des résultats de l'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

#### *Conclusions*

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773.
- (2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. In Vitro* 21, 428-437.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Disponible à l'adresse suivante: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. *J Appl Toxicol.* 35, 1318-1332.
- (5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. *J Appl Toxicol.* 35, 1333-1347.
- (6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 63, 489-504.
- (7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 69, 371-379.
- (8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization

- hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 71, 337-351.
- (9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. *Arch Toxicol.* 89, 2355-2383.
- (10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol.* DOI 10.1002/jat.3281.
- (11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. *Toxicol. In Vitro* 26, 1150-60.
- (12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Disponible à l'adresse suivante: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing>
- (13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Disponible à l'adresse suivante: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations>
- (14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599-609.
- (15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). *Altern. Lab. Anim.* 38, 275-284.
- (16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch Toxicol* 87, 1683-1969.

- (17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (6<sup>th</sup> report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.
- (18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Disponible à l'adresse suivante: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamoto K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.
- (20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7<sup>th</sup> report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.
- (21) OCDE (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Série de l'OCDE sur les essais et évaluations. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris, France, 2005, 96 pp.
- (22) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Série sur les essais et évaluations N° 168. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (23) Organisation des Nations unies (2013). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). Cinquième édition révisée. New York & Genève: Publications des Nations unies. ISBN: 978-92-1-216531-8. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_f.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html)
- (24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).
- (25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H,

Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

## Appendice 1.1

### DÉFINITIONS

**Précision:** étroitesse de l'accord entre les résultats de l'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de l'essai et l'un des aspects de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé au sens de «concordance», pour qualifier la proportion de résultats corrects d'un essai (21).

**AOP (*Adverse Outcome Pathway, voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables*):** séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable *in vivo*, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques analogues et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (22).

**Produit chimique:** une substance ou un mélange.

**CV75:** concentration estimée générant une viabilité cellulaire de 75 %.

**CE150:** concentrations générant des IRF de 150 pour l'expression de CD86.

**CE200:** concentrations générant des IRF de 200 pour l'expression de CD54.

**Cytométrie en flux:** technique de cytométrie dans laquelle des cellules en suspension dans un fluide passent une par une dans un faisceau d'excitation lumineuse, le schéma de diffusion de la lumière étant caractéristique des cellules et de leurs composants; les cellules sont souvent marquées avec des marqueurs fluorescents pour que la lumière soit d'abord absorbée puis émise à nouveau à une autre fréquence.

**Danger:** propriété intrinsèque d'un agent ou situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

**IATA (*Integrated Approaches to Testing and Assessment, approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation*):** approche structurée utilisée dans l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou dans l'évaluation de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les données pertinentes dans le but d'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

**Témoin avec milieu:** réplicat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons témoins traités ou non avec le produit chimique d'essai afin de déterminer si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

**Mélange:** mélange ou solution constitué(e) d'au moins deux substances.

**Substance mono-constituant:** substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

**Substance multi-constituants:** substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent dans une concentration  $\geq 10$  % (m/m) et  $< 80$  % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est qu'un mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans qu'il se produise de réaction chimique. Une substance multi-constituants est le résultat d'une réaction chimique.

**Témoin positif:** répliquat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour qu'il soit possible d'évaluer la variabilité dans le temps de la réponse du témoin positif, l'intensité maximale de celle-ci ne doit pas être excessive.

**Pré-haptènes:** produits chimiques devenant sensibilisants suite à une transformation abiotique.

**Pro-haptènes:** produits chimiques acquérant un potentiel de sensibilisation cutanée suite à une activation enzymatique.

**Intensité relative de fluorescence (IRF):** valeur relative de la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (IMF) des cellules exposées au produit chimique comparée à l'IMF des cellules exposées au solvant/véhicule.

**Pertinence:** décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. Elle tient compte de la précision (concordance) de l'essai (21).

**Fiabilité:** indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'un essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (21).

**Épreuve:** consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un solvant/véhicule et à un témoin positif.

**Sensibilité:** proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'un essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence de l'essai (21).

**Tampon de coloration:** tampon phosphate salin contenant 0,1 % albumine de sérum bovin.

**Témoign de solvant/véhicule:** échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, excepté le produit chimique d'essai, mais comprenant le solvant/véhicule utilisé. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous ou en dispersion stable dans le même solvant/véhicule. Testé simultanément avec un témoin avec milieu, cet échantillon indique également si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

**Spécificité:** proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'un essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence de l'essai (21).

**Substance:** élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un procédé de production, y compris tout additif nécessaire pour préserver leur stabilité ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité de la substance ni modifier sa composition.

**Produit chimique d'essai:** toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode.

**SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies):** système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (23).

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

**Essai valide:** essai dont la pertinence et la fiabilité sont jugées satisfaisantes pour des fins spécifiques, et qui repose sur des principes scientifiquement valables. Un essai n'est jamais valide dans l'absolu, mais seulement par rapport à une fin particulière (21).

## Appendice 1.2

### SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Avant d'utiliser en routine l'essai décrit dans le présent appendice à la méthode d'essai B.71, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant la prédiction attendue avec la méthode h-CLAT pour les 10 substances recommandées au tableau 1 et en obtenant des valeurs CV75, CE150 et CE200 compatibles avec les plages de référence respectives d'au moins 8 substances d'épreuve sur 10. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réponses possibles en ce qui concerne les dangers de sensibilisation cutanée. Les autres critères de sélection étaient la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la disponibilité de données de référence de grande qualité *in vivo* et *in vitro* générées avec la méthode h-CLAT. Des données de référence publiées pour la méthode h-CLAT sont par ailleurs disponibles (3) (14).

**Tableau 1:** Substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode h-CLAT

Substances d'épreuve de compétence	N° CAS	État physique	Prédiction <i>in vivo</i> <sup>1</sup>	CV75 plage de référence en µg/ml <sup>2</sup>	Résultats h-CLAT pour CD86 (CE150 plage de référence en µg/ml) <sup>2</sup>	Résultats h-CLAT pour CD54 (C200 plage de référence en µg/ml) <sup>2</sup>
2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Solide	Sensibilisant (extrême)	2-12	Positive (0.5-10)	Positive (0.5-15)
4-Phénylènediamine	106-50-3	Solide	Sensibilisant (fort)	5-95	Positive (< 40)	Négative (> 1.5) <sup>3</sup>
Sulfate de nickel	10101-97-0	Solide	Sensibilisant (modéré)	30-500	Positive (< 100)	Positive (10-100)
Mercapto-2-benzothiazole	149-30-4	Solide	Sensibilisant (modéré)	30-400	Négative (> 10) <sup>3</sup>	Positive (10-140)
R(+)-Limonène	5989-27-5	Liquide	Sensibilisant (faible)	> 20	Négative (> 5) <sup>3</sup>	Positive (< 250)
Imidazolidinyl urée	39236-46-9	Solide	Sensibilisant (faible)	25-100	Positive (20-90)	Positive (20-75)
Isopropanol	67-63-0	Liquide	Non-Sensibilisant	> 5 000	Négative (> 5 000)	Négative (> 5 000)
Glycérol	56-81-5	Liquide	Non-Sensibilisant	> 5 000	Négative (> 5 000)	Négative (> 5 000)
Acide lactique	50-21-5	Liquide	Non-Sensibilisant	1 500-5 000	Négative (> 5 000)	Négative (> 5 000)
Acide 4-aminobenzoïque	150-13-0	Solide	Non-Sensibilisant	>1 000	Négative (> 1 000)	Négative (> 1 000)

Abréviations: N° CAS = Numéro d'enregistrement au *Chemical Abstracts Service*

<sup>1</sup> Prédiction de danger (et de puissance) *in vivo* d'après les données ELGL (3) (14). La puissance *in vivo* est déterminée d'après les critères proposés par l'ECETOC (24).

<sup>2</sup> Basée sur les valeurs historiques observées (13) (25).

<sup>3</sup> Historiquement, la majorité des résultats obtenus pour ce marqueur étaient négatifs, on attend donc un résultat le plus souvent

négalif. La plage indiquée a été définie sur la base des quelques résultats positifs historiques. En cas de résultat positif, la valeur EC doit être comprise dans la plage de référence indiquée.

## Appendice 2

### **SENSIBILISATION CUTANÉE *IN VITRO*: TEST D'ACTIVATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE U937 (U-SENS™)**

#### **REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES**

1. L'essai U-SENS™ permet de quantifier les variations d'expression des marqueurs cellulaires de surface associés au processus d'activation des monocytes et des DC (i.e. CD86), dans la lignée cellulaire de lymphome histiocytaire humain U937, à la suite de l'exposition à des sensibilisants (1). Le niveau d'expression mesuré pour le marqueur de surface CD86 dans la lignée cellulaire U937 peut alors apporter une aide pour distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés.
2. L'essai U-SENS™ a fait l'objet d'une étude de validation (2) coordonnée par L'Oréal, suivie d'un examen indépendant par des pairs sous la conduite du Comité scientifique consultatif (ESAC) du Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les méthodes de substitution à l'expérimentation animale (EURL ECVAM) (3). Après analyse des preuves disponibles et sur avis des organismes de régulation et des parties prenantes, l'EURL ECVAM a recommandé l'utilisation de la méthode U-SENS™ (4) dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants à des fins de classification et d'étiquetage des dangers. Dans son Guide relatif à la production de rapports sur les approches structurées d'intégration des données et d'utilisation de sources individuelles d'information dans le cadre d'une approche IATA pour la sensibilisation cutanée, l'OCDE analyse actuellement plusieurs études de cas décrivant diverses stratégies d'essai et différents modèles prédictifs. L'une des approches définies repose sur l'essai U-SENS (5). On trouvera dans la littérature (4), (5) (7) des exemples d'utilisation des données U-SENS™ combinées à d'autres sources d'information, y compris des données historiques et des données humaines valides pré-existantes (6).
3. Il a été démontré que l'essai U-SENS™ est transférable à des laboratoires expérimentés dans le domaine des cultures cellulaires et de l'analyse par cytométrie en flux. Le niveau de reproductibilité attendu des prédictions faites par l'essai est de l'ordre de 90 % intra-laboratoire et 84 % inter-laboratoires (8). L'étude de validation (8) et d'autres études publiées (1) ont permis de conclure que, comparé aux résultats obtenus par la méthode ELGL, la précision de distinction entre sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH/CLP) et non-sensibilisants est de 86 % (N = 166), la sensibilité est de 91 % (118/129) et la spécificité est de 65 % (24/37). En comparaison avec les résultats obtenus chez l'humain, la précision de distinction entre sensibilisants cutanés (catégorie 1 du SGH/CLP) et non-

sensibilisants est de 77 % (N = 101), la sensibilité est de 100 % (58/58) et la spécificité est de 47 % (20/43). En comparaison avec la méthode ELGL, il est probable que les faux-négatifs dans les prédictions effectuées avec la méthode U-SENS™ concernent plus de produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau faible à modérée (c'est-à-dire sous-catégorie 1B du SGH/CLP) que de produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau élevée (c'est-à-dire sous-catégorie 1A du SGH/CLP) (1) (8) (9). L'ensemble de ces données montre l'utilité de l'essai U-SENS™ comme élément contribuant à l'identification des dangers de sensibilisation cutanée. Cependant, les valeurs relatives à la précision de l'essai U-SENS™ utilisé seul n'ont qu'un caractère indicatif, car cet essai doit être combiné à d'autres sources d'information dans le contexte d'une démarche IATA, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 7 et 8 et à l'Introduction. Au demeurant, dans l'évaluation des méthodes d'étude de la sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres méthodes d'expérimentation animale ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'espèce d'intérêt, à savoir l'être humain.

4. Les données actuellement disponibles montrent que l'essai U-SENS™ est applicable à des produits chimiques (y compris des ingrédients cosmétiques tels que conservateurs, surfactants, substances actives, colorants) couvrant divers groupes fonctionnels organiques, propriétés physico-chimiques, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études *in vivo*) et l'ensemble des mécanismes de réaction connus associés à la sensibilisation cutanée (i.e., accepteur de Michael, synthèse d'une base de Schiff, agent acylant, substitution nucléophile bimoléculaire [SN<sub>2</sub>] ou substitution nucléophile aromatique [S<sub>N</sub>Ar]) (1) (8) (9) (10). L'essai U-SENS™ est applicable aux produits chimiques solubles ou formant une dispersion stable (colloïde ou suspension dans laquelle le produit chimique d'essai ne se dépose pas et ne se sépare pas du solvant/véhicule en formant plusieurs phases) dans un solvant/véhicule adapté (voir paragraphe 13). Les produits chimiques de la base de données signalés comme des pré-haptènes (substances activées par oxydation) ou des pro-haptènes (substances nécessitant une activation enzymatique, par exemple via des enzymes P450) ont été correctement identifiés par l'essai U-SENS™ (1) (10). Les substances pouvant conduire à la rupture de la membrane peuvent générer des faux-positifs dus à une augmentation non spécifique de l'expression de CD86. En effet, 3/7 faux-positifs comparés à la classification de référence *in vivo* étaient des surfactants (1). Pour cette raison, les résultats positifs avec les surfactants doivent être traités avec précaution, tandis que les résultats négatifs avec les surfactants peuvent être utilisés pour étayer l'identification du produit chimique d'essai comme non-sensibilisant. Il est possible de tester des produits chimiques fluorescents avec l'essai U-SENS™ (1), cependant les produits fortement fluorescents qui émettent dans la même longueur d'onde que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou que l'iodure de propidium (IP) causent une interférence avec la détection par cytométrie en flux. Ces produits ne peuvent donc pas être

adéquatement analysés avec des anticorps conjugués au FITC (risque de faux-négatif) ou à l'IP (viabilité non mesurable). Dans ce cas, on peut recourir respectivement au marquage des anticorps par d'autres fluorochromes, ou à d'autres marqueurs de cytotoxicité, respectivement, à condition qu'il soit démontré, p.ex. en testant les substances d'épreuve de compétence citées à l'appendice 2.2, que ces techniques génèrent des résultats similaires aux anticorps marqués au FITC ou à l'IP (voir paragraphe 18). À la lumière de ce qui précède, les résultats positifs avec les surfactants et les résultats négatifs avec des produits chimiques fortement fluorescents devront être interprétés dans le contexte des limites indiquées et combinés avec d'autres sources d'information dans le cadre d'une démarche IATA. S'il est démontré que l'essai U-SENS™ n'est pas applicable à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques d'essai, cet essai ne doit pas leur être appliqué.

5. Comme indiqué ci-dessus, l'essai U-SENS™ aide à distinguer les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants. Cependant, utilisée dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, elle peut aussi contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation. Des travaux complémentaires, s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer de quelle façon les résultats de l'essai U-SENS™ pourraient venir à l'appui de ce type d'évaluation.
6. Les définitions sont fournies à l'Appendice 2.1.

## PRINCIPE DE L'ESSAI

7. L'essai U-SENS™ est un essai *in vitro* qui permet de quantifier les variations d'expression du marqueur de surface CD86 des cellules de la lignée cellulaire de lymphome histiocyttaire humain (cellules U937) après une exposition de  $45 \pm 3$  heures à un produit chimique d'essai. Le marqueur de surface CD86 est typique de l'activation des cellules U937. Il s'agit d'une molécule de costimulation connue pour simuler l'activation monocytaire, étape critique dans l'amorçage des lymphocytes T. La variation d'expression du marqueur de surface CD86 est mesurée par cytométrie en flux après coloration cellulaire avec des anticorps marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). La cytotoxicité est mesurée en parallèle (en utilisant l'IP, par exemple) pour savoir si la surexpression du marqueur de surface CD86 a lieu à des concentrations inférieures au niveau de cytotoxicité. L'indice de stimulation du marqueur de surface CD86, comparé à celui du témoin de solvant/véhicule, est calculé et inséré dans un modèle prédictif (voir paragraphe 19), pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants.

## DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

8. Avant d'utiliser en routine l'essai décrit dans le présent appendice à la méthode d'essai B.71, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en appliquant la méthode aux dix substances d'épreuve listées à l'appendice 2.2, conformément aux Bonnes pratiques pour les méthodes *in vitro* (11). En outre, les utilisateurs de l'essai devront conserver une base de données historiques générées avec les vérifications de réactivité (voir paragraphe 11), avec le témoin positif et avec le témoin de solvant/véhicule (voir paragraphes 15-16), et devront utiliser ces données pour confirmer la reproductibilité à long terme de l'essai au sein de leur laboratoire.

## PROCÉDURE

9. 1. Le présent essai est basé sur le protocole U-SENS™ n° 183 de la base de données sur les méthodes de substitution (DB-ALM) (12). Le mode opératoire normalisé doit être suivi lors de la mise en œuvre et de l'exécution de l'essai U-SENS™ en laboratoire. Un système automatisé d'utilisation du U-SENS™ peut être employé s'il est prouvé qu'il génère des résultats comparables, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice 2.2. On trouvera dans ce qui suit une description des principaux éléments et modes opératoires pour l'essai U-SENS™.

### Préparation des cellules

10. Il convient d'utiliser la lignée cellulaire de lymphome histiocytaire humain, U937 (13), pour mettre en œuvre l'essai U-SENS™. Les cellules (clone CRL1593.2) seront obtenues auprès d'une banque de cellules reconnue, par exemple l'*American Type Culture Collection*.
11. Les cellules U937 sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide à 5 % CO<sub>2</sub>, dans un milieu de culture RPMI-1640 supplémenté avec 10 % sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM L-glutamine, 100 unités/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine (milieu complet). Les cellules U937 sont repiquées régulièrement tous les 2 ou 3 jours à une densité de 1,5 ou 3 x 10<sup>5</sup> cellules/ml, respectivement. La densité cellulaire n'excède pas 2 x 10<sup>6</sup> cellules/ml et la viabilité cellulaire mesurée par l'exclusion du bleu de Trypan est ≥ 90 % (ce critère ne doit pas être appliqué au premier passage après décongélation). Avant utilisation pour l'essai, chaque lot de cellules, de SVF ou d'anticorps doit être qualifié par une vérification de réactivité. La vérification de réactivité des cellules est réalisée avec le témoin positif, l'acide picrylsulfonique (acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique: TNBS) (N°CAS 2508-19-2, pureté ≥ 99 %) et avec le témoin positif, l'acide lactique (N°CAS 50-21-5, pureté ≥ 85 %) au moins une semaine après décongélation. La vérification de réactivité est réalisée avec six concentrations finales pour chacun des témoins (TNBS: 1; 12,5; 25; 50; 75; 100 µg/ml et acide lactique: 1; 10; 20; 50; 100; 200 µg/mL). Le TNBS dissous dans du milieu complet doit

générer une réponse positive pour CD86 dépendante de la concentration (i.e. à partir d'une concentration donnant une réponse positive, I.S.  $CD86 \geq 150$ , la concentration supérieure donne une I.S. CD86 croissante) et l'acide lactique dissous dans du milieu complet doit générer une réponse négative pour CD86 (voir paragraphe 21). Seuls les lots de cellules soumis avec succès et à deux reprises à la vérification de réactivité sont utilisés dans l'essai. Les cellules peuvent être repiquées jusqu'à sept semaines après décongélation. Un maximum de 21 repiquages est possible. La vérification de réactivité doit être réalisée suivant le protocole décrit aux paragraphes 18 à 22.

12. Pour l'essai, les cellules U937 sontensemencées à une densité de  $3 \times 10^5$  cellules/ml ou de  $6 \times 10^5$  cellules/ml, puis pré-cultivées dans des flacons de culture pendant 2 ou 1 jour(s), respectivement. D'autres conditions de pré-culture que celles indiquées ci-dessus peuvent être utilisées, à condition que les raisons scientifiques en soient expliquées et s'il est prouvé que ces conditions génèrent des résultats comparables, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice 2.2. Le jour de l'essai, les cellules sont récoltées depuis le flacon de culture et suspendues à une densité de  $5 \times 10^5$  cellules/ml dans un milieu frais. Les cellules sont ensuiteensemencées dans une plaque 96 puits à fond plat, à raison de 100  $\mu$ l/puits (densité cellulaire finale  $0,5 \times 10^5$  cellules/puits).

#### **Préparation des produits chimiques d'essai et des témoins**

13. L'évaluation de la solubilité est réalisée avant l'essai. À cet effet, les produits chimiques d'essai sont dissous ou dispersés de façon stable à une concentration de 50 mg/ml, en choisissant de préférence comme solvant/véhicule le milieu complet, ou, en deuxième option, le diméthylsulfoxyde (DMSO, pureté  $\geq 99$  %) si le produit chimique d'essai n'est pas soluble dans le milieu complet. Pour l'essai, la concentration finale du produit chimique d'essai est de 0,4 mg/ml en milieu complet si le produit chimique est soluble dans ce solvant/véhicule. Si le produit chimique n'est soluble que dans le DMSO, la concentration du produit chimique d'essai est de 50 mg/ml. Il est possible d'utiliser d'autres solvants/véhicules que ceux indiqués ci-dessus, à condition que les raisons scientifiques en soient expliquées. Il importe de tenir compte de la stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant/véhicule.
14. Les produits chimiques d'essai et les substances témoin sont préparés le jour de l'essai. Étant donné qu'aucun essai de détermination de la dose n'est mené, on testera, pour la première épreuve, six concentrations finales (1, 10, 20, 50, 100 et 200  $\mu$ g/ml) dans le solvant/véhicule correspondant, soit du milieu complet, soit du DMSO à 0,4 % dans du milieu. Pour les épreuves suivantes, en partant de solutions de produits chimiques d'essai à une concentration de 0,4 mg/ml dans du milieu complet ou de 50 mg/ml dans du DMSO, au moins quatre solutions de travail (i.e. au moins quatre concentrations) sont préparées avec le solvant/véhicule correspondant. Pour finir, les solutions de travail sont utilisées

pour le traitement en ajoutant un même volume de cellules U937 en suspension (voir paragraphe 11 ci-dessus) au volume de solution de travail dans la plaque, pour parvenir à une dilution supplémentaire de facteur 2 (12). Les concentrations (au moins quatre) pour toute épreuve supplémentaire sont choisies en fonction des résultats particuliers de toutes les épreuves précédentes (8). Les concentrations finales utilisables sont 1; 2; 3; 4; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 120; 140 ; 160; 180 et 200 µg/mL. La concentration finale maximale est 200 µg/ml. Si une valeur positive est obtenue pour CD86 à 1 µg/ml, il convient de tester à 0,1 µg/ml pour trouver la concentration de produit chimique d'essai qui ne franchit pas le seuil de positivité de CD86. Pour chaque épreuve, la valeur EC150 (concentration à laquelle les produits chimiques d'essai atteignent le seuil de positivité de 150 % pour CD86, voir paragraphe 19) est calculée si une réponse positive pour CD86 dépendante de la concentration est observée. Si un produit chimique d'essai induit une réponse positive pour CD86 non dépendante de la concentration, le calcul de la valeur EC150 peut ne pas être pertinent, comme décrit au protocole U-SENS™ DB-ALM n°183 (12). Pour chaque épreuve, la valeur CV70 (concentration à laquelle les produits chimiques d'essai atteignent le seuil de cytotoxicité de 70 %, voir paragraphe 19) est calculée chaque fois que possible (12). Pour évaluer l'effet reliant la concentration à la réponse pour CD86, toutes les concentrations choisies parmi les concentrations utilisables doivent être bien réparties entre l'EC150 (ou la concentration la plus élevée non cytotoxique induisant une réponse négative pour CD86) et la VC70 (ou la plus haute concentration permise, i.e. 200 µg/ml). Au moins quatre concentrations par épreuve doivent être testées, avec au moins deux concentrations communes avec la ou les épreuve(s) précédente(s), à des fins de comparaison.

15. Le témoin de solvant/véhicule utilisé dans l'essai U-SENS™ est le milieu complet (pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable) (voir paragraphe 4) ou le DMSO à 0,4 % dans du milieu complet (pour les produits chimiques d'essai dissous ou en dispersion stable dans le DMSO).
16. Le témoin positif utilisé dans l'essai U-SENS™ est le TNBS (voir paragraphe 11), préparé dans du milieu complet. Le TNBS doit être utilisé comme témoin positif dans la mesure de l'expression de CD86 à une concentration finale unique dans la plaque (50 µg/ml) générant une viabilité cellulaire > 70 %. Pour arriver à une concentration de 50 µg/ml de TNBS dans la plaque, une solution de base de TNBS à 1 M (soit 293 mg/ml) dans du milieu complet est préparée, avant de procéder à une dilution de facteur de 2930 dans du milieu complet jusqu'à obtenir une solution de travail à 100 µg/ml. L'acide lactique (CAS 50-21-5) est utilisé comme témoin négatif à 200 µg/ml dissous dans du milieu complet (à partir d'une solution de base à 0,4 mg/ml). Pour chaque plaque de chaque épreuve, trois répliqués de milieu complet témoin non traité, de témoin de solvant/véhicule et de témoins négatif et

positif, sont préparés (12). D'autres témoins positifs adaptés peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour en dériver des critères d'acceptabilité comparables pour les épreuves. Les critères d'acceptabilité de l'épreuve sont identiques à ceux des produits chimiques d'essai (voir paragraphe 12).

### **Application des produits testés et des témoins**

17. Le témoin de solvant/véhicule ou les solutions de travail décrites aux paragraphes 14 à 16 sont mélangés en proportion 1:1 (v/v) avec les suspensions de cellules préparées dans la plaque microtitre 96 puits à fond plat (voir paragraphe 12). Les plaques traitées sont placées en incubation pendant  $45 \pm 3$  heures à  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . Avant incubation, les plaques sont scellées avec une membrane semi-perméable, afin d'éviter toute évaporation de produits chimiques d'essai volatiles et toute contamination croisée entre les cellules traitées avec les produits chimiques d'essai (12).

### **Coloration cellulaire**

18. Après une exposition de  $45 \pm 3$  heures, les cellules sont transférées dans une plaque microtitre à fond conique et collectées par centrifugation. L'interférence de solubilité correspond à la présence de cristaux ou de gouttelettes visibles au microscope après  $45 \pm 3$  heures de traitement et avant coloration cellulaire. Les surnageants sont éliminés et les cellules restantes sont rincées une fois dans 100  $\mu\text{l}$  tampon phosphate salin (PBS) glacé contenant 5 % sérum de veau fœtal (tampon de coloration). Les cellules sont centrifugées, puis re-suspendues dans 100  $\mu\text{L}$  tampon de coloration et colorées avec 5  $\mu\text{l}$  (soit 0,25  $\mu\text{g}$ ) anticorps anti-CD86 ou anticorps murins isotype IgG1 marqués au FITC, à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Les anticorps décrits dans le protocole U-SENS<sup>TM</sup> DB-ALM n°183 (12) doivent être utilisés (pour CD86: BD-PharMingen #555657 Clone: Fun-1, ou Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Clone: BU63; pour IgG1: BD-PharMingen #555748, ou Caltag/Invitrogen # GM4992). L'expérience acquise lors de la mise au point de l'essai indique que l'intensité de la fluorescence des anticorps est généralement comparable d'un lot à un autre. Il est possible d'utiliser d'autres clones ou d'autres fournisseurs d'anticorps pour l'essai, si ceux-ci ont été soumis avec succès à la vérification de réactivité (voir paragraphe 11). Cependant, les utilisateurs peuvent souhaiter procéder au titrage des anticorps dans leurs conditions de laboratoire, afin de déterminer la concentration la mieux adaptée. D'autres méthodes de détection, par exemple des anticorps anti-CD86 marqués avec d'autres fluorochromes, peuvent être utilisées s'il est prouvé qu'elles génèrent des résultats comparables aux anticorps marqués au FITC, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice 2.2. Après deux rinçages dans 100  $\mu\text{l}$  tampon de coloration et un rinçage dans 100  $\mu\text{l}$  PBS glacé, les cellules sont suspendues dans du PBS glacé (par exemple, 125  $\mu\text{l}$  pour les échantillons analysés tube après tube, manuellement, ou 50  $\mu\text{l}$  pour une plaque d'auto-échantillonneur) et on ajoute la solution

d'IP (concentration finale 3 µg/ml). D'autres marqueurs de cytotoxicité tels que la 7-aminoactinomycine D (7-AAD) ou le bleu de Trypan peuvent être utilisés comme colorants s'il est prouvé qu'ils génèrent des résultats comparables à l'IP, par exemple en testant les substances d'épreuve figurant à l'appendice 2.2.

### Analyse par cytométrie en flux

19. Le niveau d'expression de CD86, ainsi que la viabilité cellulaire, sont analysés par cytométrie en flux. Les cellules sont placées sur graphique à points à échelle logarithmique, suivant leur taille (FSC) et leur granularité (SSC), pour repérer clairement la population dans la fenêtre R1 et éliminer les débris. L'objectif est d'acquérir 10 000 cellules dans la fenêtre R1, pour chaque puits. Les cellules appartenant à une même fenêtre R1 sont représentées sur un graphique à points FL3 ou FL4/SSC. Les cellules viables sont identifiées en traçant une deuxième fenêtre R2 de sélection de la population cellulaire négative à l'iodure de propidium (canaux FL3 ou FL4). La viabilité cellulaire est calculée par le programme d'analyse du cytomètre suivant l'équation ci-après. Si la viabilité cellulaire est faible, il convient d'acquérir jusqu'à 20 000 cellules, dont des cellules mortes. Une autre option est d'acquérir les données pendant une minute après le début de l'analyse.

$$\text{Viabilité cellulaire} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{\text{Nombre total de cellules acquises}} \times 100$$

Le pourcentage de cellules FL1-positives est ensuite mesuré parmi les cellules viables retenues dans la fenêtre R2 (sous-fenêtre de R1). L'expression de CD86 à la surface cellulaire est analysée au moyen d'un graphique à points FL1/SSC ne prenant en compte que les cellules viables (R2).

Pour les puits contenant du milieu complet/IgG1, le seuil d'analyse est fixé proche de la population principale pour que les témoins en milieu complet présentent une valeur IgG1 dans la zone cible de 0,6 à 0,9 %.

L'interférence de couleur est définie comme un décalage de la dispersion correspondant aux IgG1 marqués au FITC (moyenne géométrique d'I.S. IgG1 FL1  $\geq$  150 %).

L'indice de stimulation (I.S.) de CD86 pour les cellules témoin (non traitées ou dans du DMSO à 0,4 %) et pour les cellules traitées avec les produits chimiques est obtenu par le calcul suivant:

$$I.S. = \frac{\% \text{ cellules traitées CD86}^+ - \% \text{ cellules traitées IgG1}^+}{\% \text{ cellules témoin CD86}^+ - \% \text{ cellules témoin IgG1}^+} \times 100$$

% cellules témoin non traitées IgG1+: pourcentage de cellules FL1-positives reconnues par IgG1 dépassant le seuil d'analyse (plage d'acceptation  $\geq$  0,6 % et  $<$  1,5 %, voir

paragraphe 22) parmi les cellules viables non traitées.

% cellules témoin IgG1+ ou traitées CD86+: pourcentage de cellules FL1-positives reconnues par IgG1 ou CD86 mesuré sans déplacer le seuil d'analyse, parmi les cellules viables témoin ou traitées.

## RÉSULTATS ET RAPPORT

### Évaluation des données

20. Les paramètres suivants sont calculés dans l'essai U-SENS™: valeur CV70, c'est-à-dire la concentration générant une survie de 70 % des cellules U937 (cytotoxicité 30 %) et la valeur EC150, c'est-à-dire la concentration à laquelle les produits chimiques d'essai induisent un indice de stimulation (I.S.) de CD86 de 150 %.

La valeur CV70 est calculée par interpolation semi-logarithmique suivant l'équation ci-après:

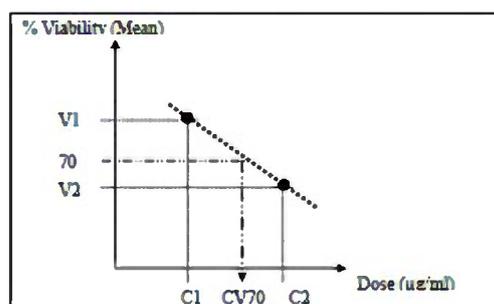
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

où:

V1 est la valeur minimum de viabilité cellulaire supérieure à 70 %

V2 est la valeur maximum de viabilité cellulaire inférieure à 70 %

C1 et C2 sont les concentrations auxquelles les viabilisés cellulaires V1 et V2 sont atteints, respectivement.



Il est possible d'employer d'autres approches pour déduire la valeur CV70, à condition que cela ne modifie pas les résultats (par exemple, en testant les substances d'épreuve).

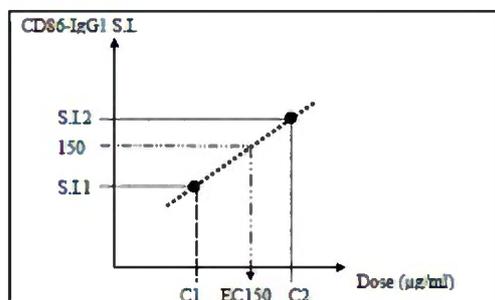
L'EC150 est calculée par interpolation log-linéaire suivant l'équation ci-après:

$$EC150 = C1 + [(150 - S.I.1) / (S.I.2 - S.I.1) * (C2 - C1)]$$

où:

C1 est la concentration la plus élevée, en µg/ml, avec un I.S. CD86 < 150 % (I.S. 1).

C2 est la concentration la plus faible, en  $\mu\text{g/ml}$ , avec un I.S. CD86  $\geq 150\%$  (I.S. 2)



Les valeurs EC150 et CV70 sont calculées

- pour chaque épreuve: les valeurs EC150 et CV70 sont utilisées comme outils d'investigation de l'effet reliant la concentration à la réponse dans la surexpression de CD86 (voir paragraphe 14),
- la valeur CV70 globale est déterminée en fonction de la viabilité moyenne (12),
- la valeur EC150 globale d'un produit chimique d'essai dont la prédiction est un résultat POSITIF avec l'essai U-SENS<sup>TM</sup> est déterminée en fonction des valeurs moyennes d'I.S. CD86 (voir paragraphe 21) (12).

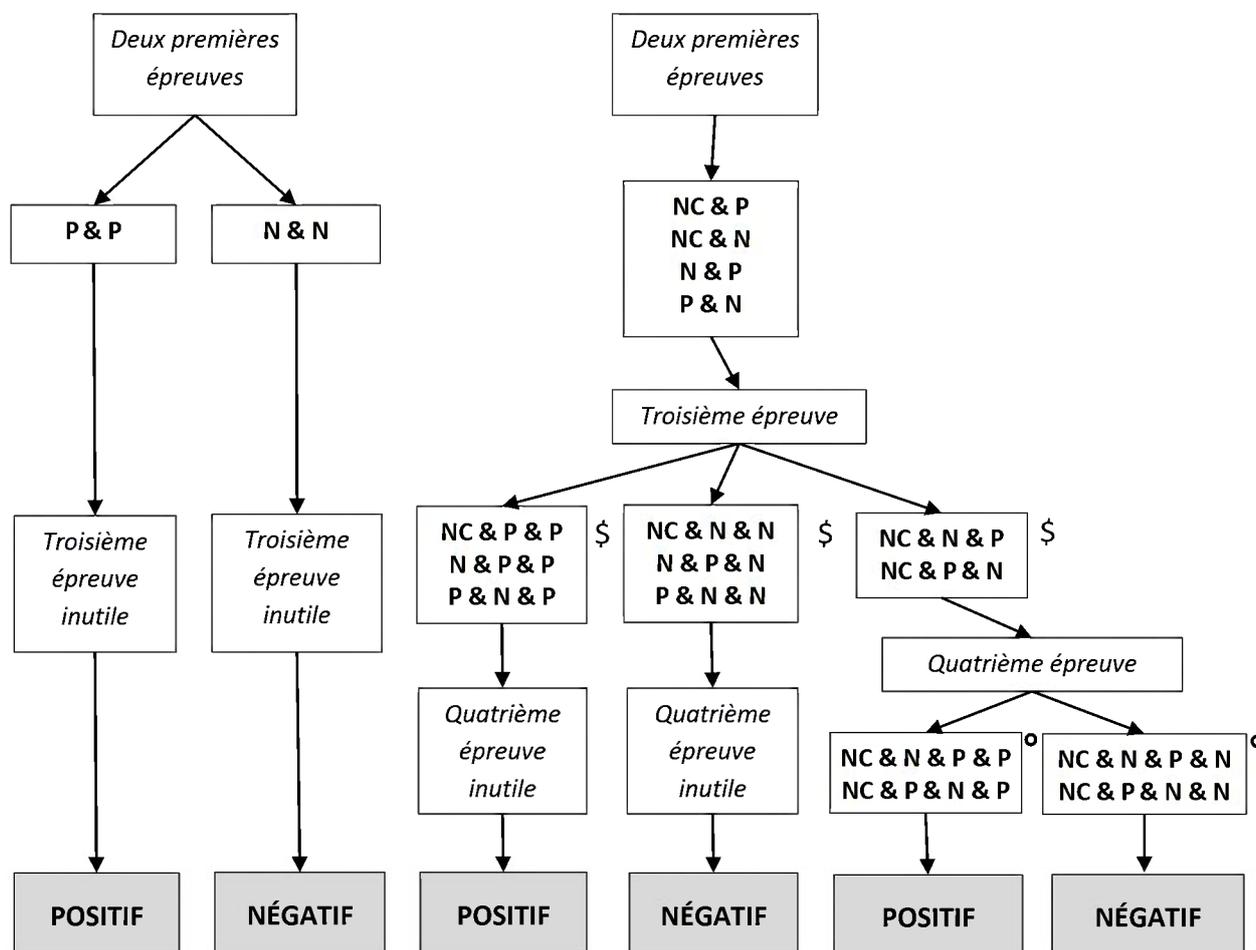
### Modèle prédictif

21. Pour les mesures d'expression de CD86, chaque produit chimique d'essai est testé à au moins quatre concentrations et dans au moins deux épreuves indépendantes (réalisées en des jours distincts) pour arriver à une prédiction unique (NÉGATIF ou POSITIF).
- La conclusion individuelle pour une épreuve U-SENS<sup>TM</sup> est Négative (ci-après N) si l'I.S. de CD86 est inférieur à 150 % à toutes les concentrations non cytotoxiques (viabilité cellulaire  $\geq 70\%$ ) et si aucune interférence n'est observée (cytotoxicité, solubilité: voir paragraphe 18, ou couleur: voir paragraphe 19, quelles que soient les concentrations non cytotoxiques auxquelles l'interférence est détectée). Dans tous les autres cas: pour un I.S. de CD86 supérieur ou égal à 150 % et/ou l'observation d'une interférence, la conclusion individuelle pour une épreuve U-SENS<sup>TM</sup> est Positive (ci-après P).
  - Une prédiction U-SENS<sup>TM</sup> est considérée comme NÉGATIVE si au moins deux épreuves indépendantes génèrent un résultat négatif (N) (Figure 1). Si les deux premières épreuves génèrent un résultat N, la prédiction U-SENS<sup>TM</sup> est considérée comme NÉGATIVE et il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve.
  - Une prédiction U-SENS<sup>TM</sup> est considérée comme POSITIVE si au moins deux épreuves indépendantes génèrent un résultat positif (P) (Figure 1). Si les deux premières épreuves

gènèrent un résultat P, la prédiction U-SENS™ est considérée comme POSITIVE et il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve.

- Étant donné qu'aucun essai de détermination de la dose n'est mené, le cas où, lors de la première épreuve, l'I.S. de CD86 est supérieur ou égal à 150 % à la plus haute concentration non cytotoxique seulement, constitue une exception. Dans ce cas, l'épreuve est considérée comme NON CONCLUANTE (NC) et d'autres concentrations doivent être testées lors d'épreuves supplémentaires (entre la plus haute concentration non cytotoxique et la plus faible concentration cytotoxique, voir paragraphe 20). Si une épreuve est considérée comme NC, il convient de mener au moins deux épreuves supplémentaires, voire trois si les résultats des épreuves deux et trois sont non-concordants (N et/ou P, au choix) (Figure 1). Les épreuves suivantes sont considérées comme positives même si seule l'une des concentrations non cytotoxiques génère une valeur pour CD86 supérieure ou égale à 150 %, étant donné que les paramètres de concentration ont été adaptés spécifiquement à ce produit chimique d'essai. La prédiction finale s'appuie sur le résultat majoritaire pour l'ensemble des trois ou quatre épreuves individuelles (soit 2 sur 3 ou 2 sur 4) (Figure 1).

**Figure 1:** modèle prédictif utilisé dans l'essai U-SENS™. Toute prédiction émise avec l'essai U-SENS™ doit être considérée dans le cadre d'une approche intégrée IATA et conformément aux dispositions du paragraphe 4 et des paragraphes 7, 8 et 9 de l'introduction.



### N: épreuve sans résultat positif pour CD86 ni interférence;

P: épreuve avec résultat positif pour CD86 et/ou interférence(s);

NC: non concluant. Première épreuve non concluante si CD86 est positif uniquement à la concentration non cytotoxique la plus élevée;

#: un résultat individuel non concluant (NC) attribué uniquement lors de la première épreuve nécessite de mener une troisième épreuve pour obtenir une majorité de résultats positifs (P) ou négatifs (N) pour au moins deux épreuves indépendantes sur trois.

§: les cases montrent les combinaisons pertinentes de résultats issus des trois épreuves sur la base des résultats obtenus dans les deux premières épreuves (cases précédentes);

°: les cases montrent les combinaisons pertinentes de résultats issus des quatre épreuves sur la base des résultats obtenus dans les trois premières épreuves (cases précédentes).

### Critères d'acceptabilité

22. Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis lors de la mise en œuvre de l'essai U-SENS™ (12)

- Après une exposition de  $45 \pm 3$  heures, la viabilité moyenne des trois réplicats de cellules U937 non traitées doit être  $> 90 \%$  et aucune dérive d'expression de CD86 ne doit être observée. La fourchette d'expression basale de CD86 dans les cellules U937 doit être  $\geq 2 \%$  et  $\leq 25 \%$ .
- Si le solvant utilisé est le DMSO, la validité du DMSO comme témoin de véhicule est évaluée en calculant l'I.S. du DMSO comparé à celui des cellules non traitées et la viabilité moyenne des trois réplicats de cellules doit être  $> 90 \%$ . Le témoin de véhicule DMSO est valide si l'I.S. moyen pour CD86 dans les trois réplicats de DMSO est inférieur à  $250 \%$  de l'I.S. moyen pour CD86 dans les trois réplicats de cellules U937 non traitées.
- Les épreuves sont considérées comme valides si au moins deux des trois valeurs IgG1 des cellules U937 non traitées sont comprises dans la plage  $\geq 0,6 \%$  et  $< 1,5 \%$ .
- Le témoin négatif (acide lactique) testé en parallèle est considéré comme valide si au moins deux des trois réplicats génèrent un résultat négatif (I.S. CD86  $< 150 \%$ ) et aucune cytotoxicité (viabilité cellulaire  $\geq 70 \%$ ).
- Le témoin positif (TNBS) est considéré comme valide si au moins deux des trois réplicats génèrent un résultat positif (I.S. CD86  $\geq 150 \%$ ) et aucune cytotoxicité (viabilité cellulaire  $\geq 70 \%$ ).

### Rapport d'essai

23. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes.

#### *Produit chimique d'essai*

##### Substance mon-constituant

- Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;
- Apparence physique, solubilité dans le milieu complet, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques, selon les données disponibles;
- Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
- Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- Concentration(s) testée(s);
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

- Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

Substance multi-constituants, UVCB ou mélange:

- Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;
- Apparence physique, solubilité dans le milieu complet, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
- Masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude;
- Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- Concentration(s) testée(s);
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
- Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

### *Témoins*

Témoin positif:

- Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;
- Apparence physique, solubilité dans le DMSO, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
- Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
- Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- Concentration(s) testée(s);
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
- Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.

Témoin négatif et solvant/véhicule témoin

- Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;

- Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
- Apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des solvants/véhicules autres que ceux mentionnés dans la Ligne directrice sont utilisés, et selon les données disponibles;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
- Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

#### *Conditions d'essai*

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;
- Description de l'essai utilisé;
- Lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et source (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple);
- Type de cytométrie en flux utilisé (modèle, par exemple), en particulier paramétrage des instruments, anticorps et marqueurs de cytotoxicité utilisés;
- Procédure appliquée pour démontrer les compétences du laboratoire dans l'exécution de l'essai au moyen des substances d'épreuve de compétence et procédure appliquée pour démontrer la reproductibilité de l'essai dans le temps, par exemple données historiques des témoins et/ou des vérifications de réactivité.

#### *Critère d'acceptabilité de l'essai*

- Viabilité cellulaire et I.S. CD86 avec le témoin de solvant/véhicule comparées aux plages d'acceptabilité;
- Viabilité cellulaire et I.S. avec le témoin positif comparées aux plages d'acceptabilité;
- Viabilité cellulaire de toutes les concentrations testées du produit chimique d'essai.

#### *Mode opératoire*

- Nombre d'épreuves effectuées;
- Concentration de produit chimique d'essai, application et moment d'exposition (si différents du moment recommandé)
- Durée d'exposition;
- Description des critères d'évaluation et de décision appliqués;
- Description de toutes modifications apportées au mode opératoire.

*Résultats*

- Tableau des données, y compris CV70 (s'il y a lieu), I.S., viabilité cellulaire, EC150 (s'il y a lieu) pour chaque produit chimique testé et substance témoin pour chaque épreuve, et indication de la classification du produit chimique d'essai d'après le modèle prédictif;
- Description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu.

*Discussion des résultats*

- Discussion des résultats obtenus par l'essai U-SENS™;
- Examen des résultats de l'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

*Conclusions*

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.
- (2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Disponible à l'adresse suivante: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations)
- (3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28178 EN; doi 10.2787/815737. Disponible à l'adresse suivante: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].
- (4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28553 EN; doi 10.2760/588955. Disponible à l'adresse suivante: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing>.
- (5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014. *Cosmetics* 3, 14.
- (6) OCDE (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Série sur les essais et évaluations No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [ <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>].
- (7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

- (8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.
- (9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.
- (10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.
- (11) OCDE. (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf).
- (12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33pp. Accessible at: [<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>].
- (13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
- (14) OCDE (2005). Série sur les essais et évaluations N° 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (15) Nations unies (2015). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, sixième édition révisée., New York & Geneva: Publications des Nations unies. Disponible à l'adresse suivante: [http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev06/French/ST-SG-AC10-30-Rev6f.pdf](http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/French/ST-SG-AC10-30-Rev6f.pdf).
- (16) OCDE (2012). Série sur les essais et évaluations N° 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to

Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Disponible à l'adresse suivante: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.

- (17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Disponible à l'adresse suivante: [https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC\\_2003-TR87.pdf](https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf).

## Appendice 2.1

### DÉFINITIONS

**Précision:** étroitesse de l'accord entre les résultats de l'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de l'essai et l'un des aspects de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé au sens de «concordance», pour qualifier la proportion de résultats corrects d'un essai (14).

**AOP (Adverse Outcome Pathway, voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables):** séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable *in vivo*, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (15).

**Réponse de CD86 liée à la concentration:** lorsqu'une concentration générant un résultat positif (I.S.  $CD86 \geq 150$ ) est suivie d'une concentration présentant un I.S. CD86 encore supérieur, l'effet est dépendant de la concentration (réponse liée à la concentration).

**Produit chimique: une substance ou un mélange.**

**CV70:** concentration estimée générant une viabilité cellulaire de 70 %.

**Dérive:** i) la valeur corrigée %CD86<sup>+</sup> pour le réplicat 3 du témoin non traité est inférieure à 50 % de la moyenne corrigée de la valeur %CD86<sup>+</sup> pour les réplicats 1 et 2 du témoin non traité; et ii) la valeur corrigée %CD86<sup>+</sup> pour le réplicat 3 du témoin négatif est inférieure à 50 % de la moyenne corrigée de la valeur %CD86<sup>+</sup> pour les réplicats 1 et 2 du témoin négatif.

**EC150:** concentrations estimées générant un I.S. de 150 % pour l'expression de CD86.

**Cytométrie en flux:** technique de cytométrie dans laquelle des cellules en suspension dans un fluide passent une par une dans un faisceau d'excitation lumineuse; la lumière est diffusée selon les caractéristiques des cellules et de leurs composants; les cellules sont souvent marquées avec des marqueurs fluorescents pour que la lumière soit d'abord absorbée puis émise à nouveau à une autre fréquence.

**Danger:** propriété intrinsèque d'un agent ou situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

**IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment, approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation):** approche structurée utilisée dans l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou dans l'évaluation de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les

données pertinentes dans le but d'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

**Mélange:** mélange ou solution constitué(e) d'au moins deux substances.

**Substance mono-constituant:** substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

**Substance multi-constituants:** substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent dans une concentration  $\geq 10$  % (m/m) et  $< 80$  % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

**Témoin positif:** répliquat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

**Pré-haptènes:** produits chimiques devenant sensibilisants suite à une transformation abiotique, par exemple par oxydation.

**Pro-haptènes:** produits chimiques acquérant un pouvoir sensibilisant pour la peau suite à une activation enzymatique.

**Pertinence:** décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) de l'essai (14).

**Fiabilité:** indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'un essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (14).

**Épreuve:** consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un solvant/véhicule et à un témoin positif.

**Sensibilité:** proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par le test. Elle permet de mesurer la précision d'un essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence de l'essai (14).

**I.S.:** indice de stimulation. Valeur relative de la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence (IMF) des cellules exposées au produit chimique comparée à l'IMF des cellules dans le solvant/véhicule.

**Témoin de solvant/véhicule:** échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, excepté le produit chimique d'essai, mais comprenant le solvant /véhicule utilisé. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous ou en dispersion stable dans le même solvant/véhicule. Testé simultanément avec un témoin avec milieu, cet échantillon indique également si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

**Spécificité:** proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'un essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence de l'essai (14).

**Tampon de coloration:** solution tamponnée de phosphate contenant 5 % sérum de veau fœtal.

**Substance:** élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un procédé de production, y compris tout additif nécessaire pour préserver leur stabilité ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité de la substance ni modifier sa composition.

**Produit chimique d'essai:** toute substance ou tout mélange soumis au présent essai..

**SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies):** système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (16).

**UVCB:** substance de composition inconnue ou variable, produit réactionnel complexe et matériaux biologiques.

**Essai valide:** essai dont la pertinence et la fiabilité sont jugées satisfaisantes pour des fins spécifiques, et qui repose sur des principes scientifiquement valables. Un essai n'est jamais valide dans l'absolu, mais seulement par rapport à une fin particulière (14).

### Appendice 2.2

Avant d'utiliser en routine l'essai décrit dans le présent appendice à la méthode d'essai B.71, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant la prédiction attendue avec l'essai U-SENS<sup>TM</sup> pour les 10 substances recommandées au tableau 1 et en obtenant des valeurs CV70 et EC150 compatibles avec les plages de référence respectives d'au moins 8 substances d'épreuve sur 10. Ces substances ont été sélectionnées de façon à représenter la gamme des réponses possibles en ce qui concerne les dangers de sensibilisation cutanée. Les autres critères étaient la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la disponibilité de données de référence *in vivo* et de données *in vitro* de grande qualité générées avec l'essai U-SENS<sup>TM</sup>. De plus, les données de référence publiées sont disponibles pour l'essai U-SENS<sup>TM</sup> (1) (8).

**Tableau 1:** substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à l'essai U-SENS<sup>TM</sup>

Substances d'épreuve de compétence	N° CAS	État physique	Prédiction <i>in vivo</i> <sup>1</sup>	U-SENS <sup>TM</sup> Solvant/ Véhicule	U-SENS <sup>TM</sup> CV70 plage de référence en µg/ml <sup>2</sup>	U-SENS <sup>TM</sup> EC150 plage de référence en µg/ml <sup>2</sup>
4-Phénylènediamine	106-50-3	Solide	Sensibilisant (fort)	Milieu complet <sup>3</sup>	< 30	Positif (≤ 10)
Acide picrylsulfonique	2508-19-2	Liquide	Sensibilisant (fort)	Milieu complet	> 50	Positif (≤ 50)
Maléate de diéthyle	141-05-9	Liquide	Sensibilisant (modéré)	DMSO	10-100	Positif (≤ 20)
Résorcinol	108-46-3	Solide	Sensibilisant (modéré)	Milieu complet	> 100	Positif (≤ 50)
Alcool cinnamique	104-54-1	Solide	Sensibilisant (faible)	DMSO	> 100	Positif (10-100)
4-Allylanisole	140-67-0	Liquide	Sensibilisant (faible)	DMSO	> 100	Positif (< 200)
Saccharine	81-07-2	Solide	Non sensibilisant	DMSO	> 200	Négatif (> 200)
Glycérol	56-81-5	Liquide	Non sensibilisant	Milieu complet	> 200	Négatif (> 200)
Acide lactique	50-21-5	Liquide	Non sensibilisant	Milieu complet	> 200	Négatif (> 200)
Acide salicylique	69-72-7	Solide	Non sensibilisant	DMSO	> 200	Négatif (> 200)

Abréviations: N°CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service

<sup>1</sup> Prédiction de danger (et de puissance) *in vivo* d'après les données ELGL (1) (8). La puissance *in vivo* est obtenue d'après les critères proposés par l'ECETOC (17).

<sup>2</sup> Basée sur les valeurs historiques observées (1) (8).

<sup>3</sup> Milieu complet: milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10 % sérum de veau fœtal, 2 mM L-glutamine, 100 unités/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine (8).

### Appendice 3

## SENSIBILISATION CUTANÉE *IN VITRO*: ESSAI IL-8 LUC

### REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

1. Contrairement à des essais visant à analyser le niveau d'expression de marqueurs de surface, le test IL-8 Luc permet de quantifier les variations d'expression de IL-8, une cytokine associée à l'activation des DC. Dans la lignée cellulaire rapporteur IL-8 dérivée de la lignée THP-1 (THP-G8, issue de la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine THP-1), l'expression d'IL-8 est mesurée à la suite de l'exposition à des sensibilisants (1). Le niveau d'expression de la luciférase est ensuite utilisé pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants cutanés.
2. 18. L'essai IL-8 Luc a fait l'objet d'une étude de validation (2) menée par le Centre japonais de validation des méthodes de substitution (JaCVAM), le **Ministère de l'économie, du commerce et de l'industrie** (METI) et la Société japonaise pour les méthodes **alternatives à l'expérimentation animale (JSAAE)**, suivie d'un examen indépendant par des pairs (3) sous la conduite du JaCVAM et du Ministère de la santé, du travail et des affaires sociales (MHLW), avec l'appui de la **Coopération internationale relative aux méthodes de substitution à l'expérimentation animale (ICATM)**. Après analyse des preuves disponibles et sur avis des organismes de régulation et des parties prenantes, l'essai IL-8 Luc est considéré comme utile dans le cadre d'une approche intégrée de type IATA, pour aider à distinguer les sensibilisants des non-sensibilisants à des fins de classification et d'étiquetage des dangers. On trouvera dans la littérature des exemples d'utilisation des données IL-8 Luc combinées à d'autres sources d'information (4) (5) (6).
3. Il a été démontré que l'essai IL-8 Luc est transférable à des laboratoires expérimentés dans le domaine des cultures cellulaires et des mesures de la luciférase. Le niveau de reproductibilité était de l'ordre de 87,7 % intra-laboratoire et 87,5 % inter-laboratoires (2). Les données obtenues lors de l'étude de validation (2) et dans les autres travaux publiés (1) (6) démontrent que, comparé à l'ELGL, l'essai IL-8 Luc a permis d'émettre une prédiction positive ou négative pour 118/143 produits chimiques, a fourni des résultats non concluants pour 25 produits chimiques et présente une précision de 86 % (101/118), une sensibilité de 96 % (92/96) et une spécificité de 41 % (9/22) pour faire la distinction entre les produits chimiques sensibilisants (catégorie 1 du SGH de l'ONU) et non sensibilisants («sans catégorie» selon le SGH de l'ONU). En ne tenant pas compte des substances en dehors du domaine d'applicabilité de la méthode, voir ci-dessous (paragraphe 5), l'essai IL-8 Luc a permis de classer 113/136 produits chimiques comme positifs ou négatifs, et 23

produits chimiques comme non concluants. La précision de l'essai IL-8 Luc est de 89 % (101/113), la sensibilité est de 96 % (92/96) et la spécificité est de 53 % (9/17). Reprenant des données chez l'humain citées dans Urbisch et al. (7), l'essai IL-8 Luc a permis de classer 76/90 produits chimiques comme positifs ou négatifs, et 14 produits chimiques comme non concluants. La précision de l'essai IL-8 Luc est de 80 % (61/76), la sensibilité est de 93 % (54/58) et la spécificité est de 39 % (7/18). En ne tenant pas compte des substances en dehors de son domaine d'applicabilité, l'essai IL-8 Luc a permis de classer 71/84 produits chimiques comme positifs ou négatifs et 13 produits chimiques comme non concluants. La précision de l'essai IL-8 Luc est de 86 % (61/71), la sensibilité est de 93 % (54/58) et la spécificité est de 54 % (7/13). Il est probable que les faux-négatifs dans les prédictions effectuées avec l'essai IL-8 Luc concernent plus de produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau faible à modérée (sous-catégorie 1B du SGH/CLP) que de produits chimiques ayant une puissance de sensibilisation de la peau élevée (sous-catégorie 1A du SGH/CLP) (6). Dans leur ensemble, les informations indiquent que l'essai IL-8 Luc aide à évaluer le potentiel de sensibilisation cutanée des produits chimiques. Les valeurs relatives à la précision de l'essai IL-8 Luc utilisé seul n'ont qu'un caractère indicatif, car cet essai doit être combiné à d'autres sources d'information dans le contexte d'une démarche IATA, et conformément aux dispositions énoncées aux paragraphes 7 et 8 et en introduction. Au demeurant, dans l'évaluation des essais de sensibilisation cutanée sans expérimentation animale, il convient de tenir compte du fait que l'ELGL et les autres essais sur animaux ne reflètent peut-être pas parfaitement la situation chez l'être humain.

4. Les données actuellement disponibles montrent que l'essai IL-8 Luc est applicable à des produits chimiques couvrant divers groupes fonctionnels organiques, mécanismes de réaction, puissances de sensibilisation cutanée (telles qu'établies par des études *in vivo*) et propriétés physico-chimiques (2) (6).
5. Certes, l'essai IL-8 Luc utilise le solvant X-VIVO™ 15, cependant il permet de classer correctement les produits chimiques présentant un  $\text{Log } K_{oe} > 3,5$  et ceux présentant une hydrosolubilité autour de 100 µg/ml telle que calculée avec le logiciel EPI Suite™. En outre, les performances de la méthode pour détecter les sensibilisants faiblement hydrosolubles sont meilleures que celles de l'essai IL-8 Luc utilisant le diméthylsulfoxyde (DMSO) comme solvant (2). Cependant, des résultats négatifs obtenus avec des produits chimiques d'essai non dissous à 20 mg/mL peuvent être des faux négatifs, car les produits chimiques sont insolubles dans le X-VIVO™ 15. Par conséquent, pour ces produits chimiques, les résultats négatifs ne doivent être considérés. Lors de l'étude de validation, un taux élevé de faux négatifs a été observé pour les anhydrides. De plus, en raison des capacités métaboliques limitées de la lignée cellulaire utilisée (8) ainsi que des conditions expérimentales, les pro-haptènes (substances nécessitant une activation enzymatique) et les

pré-haptènes (substances activées par oxydation), peuvent eux aussi donner des résultats négatifs avec cet essai. Il est à noter que, bien que les résultats négatifs obtenus avec de potentiels pré- ou pro-haptènes doivent être interprétés avec précaution, l'essai IL-8 Luc a permis d'identifier correctement 11/11 pré-haptènes, 6/6 pro-haptènes et 6/8 pré- ou pro-haptènes dans la base de données IL-8 Luc (2). L'examen complet récemment mené sur trois essais sans expérimentation animale (DPRA, KeratinoSens™ et h-CLAT) pour l'identification des pré- et pro-haptènes (9) et le fait que les cellules THP-G8 utilisées dans l'essai IL-8 Luc soient une lignée issue de la lignée THP-1 utilisée dans l'essai h-CLAT, permettent de conclure que l'essai IL-8 Luc, combiné avec d'autres essais, peut contribuer à améliorer la sensibilité des essais sans expérimentation animale dans la détection des pré- et pro-haptènes. Les surfactants testés à ce jour ont généré des (faux) positifs, quel que soit leur type (cationique, anionique ou non-ionique). Pour finir, les produits chimiques qui interfèrent avec la luciférase peuvent masquer son activité ou en empêcher les mesures, ce qui peut résulter en une apparente inhibition ou une luminescence accrue (10). Par exemple, il a été rapporté que les concentrations en phyto-œstrogènes supérieures à 1 µM provoquent une interférence avec les signaux luminescents dans d'autres essais par gène rapporteur de la luciférase, à cause d'une sur-activation du gène rapporteur de la luciférase. Par conséquent, l'expression de la luciférase observée en présence d'une forte concentration de phyto-œstrogènes ou de composés suspectés d'activer le gène rapporteur de la luciférase de manière similaire doit être examinée avec précaution (11). En se basant sur les critères ci-dessus, les surfactants, les anhydrides et les produits chimiques qui interfèrent avec la luciférase sont exclus du champ d'application de la présente méthode. S'il est démontré que l'essai IL-8 Luc n'est pas applicable à d'autres catégories spécifiques de produits chimiques d'essai, cette méthode ne doit pas leur être appliquée.

6. Comme indiqué ci-dessus, l'essai IL8-Luc aide à distinguer les sensibilisants cutanés des non-sensibilisants. Des travaux complémentaires, s'appuyant de préférence sur des données humaines, seront toutefois nécessaires pour déterminer si les résultats de l'essai IL8-Luc pourraient contribuer à l'évaluation de la puissance de sensibilisation dans le cadre d'une approche combinant d'autres sources d'information.
7. Les définitions sont fournies à l'Appendice 3.1.

## PRINCIPE DE L'ESSAI

8. L'essai IL-8 Luc utilise la lignée cellulaire de leucémie monocyttaire humaine, THP-1, obtenue auprès de l'*American Type Culture Collection* (Manassas, VA, USA). À partir de cette lignée THP-1, le département de dermatologie de l'école de médecine à l'université de Tohoku a développé la lignée THP-G8 rapporteur IL-8, laquelle contient les gènes de la luciférase orange (Stable Luciferase Orange, SLO) et rouge (Stable Luciferase Red, SLR)

placés sous le contrôle des promoteurs de IL-8 et de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), respectivement (1). Ce système permet de quantifier l'induction du gène de la luciférase en détectant la luminescence issue d'un substrat de luciférase connu pour son émission lumineuse, comme indicateur de l'activité de IL-8 et de la GAPDH dans les cellules à la suite de l'exposition à des produits chimiques sensibilisants.

9. Le test bi-couleurs comprend une luciférase émettant dans l'orange (SLO,  $\lambda_{\max} = 580$  nm) (12), marqueur de l'activation du promoteur IL-8, ainsi qu'une luciférase émettant dans le rouge (SLR,  $\lambda_{\max} = 630$  nm) (13), marqueur de l'activation du promoteur interne témoin, GAPDH. Les deux luciférases émettent dans des couleurs différentes lorsqu'elles réagissent à la d-luciférine de luciole, leur luminescence est mesurée en parallèle, lors d'une réaction en une étape, en subdivisant la lumière émise dans le mélange d'essai à l'aide d'un filtre optique (14) (voir Appendice 3.2II).
10. Les cellules THP-G8 sont traitées pendant 16 heures avec un produit chimique d'essai, puis l'activité de la luciférase SLO (SLO-LA), marqueur de l'activité du promoteur IL-8, et l'activité de la luciférase SLR (SLR-LA), marqueur de l'activité du promoteur GAPDH, sont mesurées. Par souci de lisibilité, SLO-LA et SLR-LA sont respectivement appelées IL8LA et GAPLA. On trouvera au tableau 1 une description des termes associés à l'activité de la luciférase dans l'essai IL-8 Luc. Les valeurs mesurées sont utilisées pour calculer l'IL8LA normalisée (nIL8LA), c'est-à-dire le ratio IL8LA/GAPLA. L'induction de nIL8LA (Ind-IL8LA) est le ratio de la moyenne arithmétique des quatre valeurs mesurées de nIL8LA des cellules THP-G8 traitées avec le produit chimique d'essai, divisée par la moyenne des valeurs de nIL8LA des cellules THP-G8 non traitées. L'inhibition de GAPLA (Inh-GAPLA) est le ratio de la moyenne arithmétique des quatre valeurs mesurées de GAPLA des cellules THP-G8 traitées avec le produit chimique d'essai, divisée par la moyenne des valeurs de GAPLA des cellules THP-G8 non traitées. Inh-GAPLA est un marqueur de cytotoxicité.

**Tableau 1:** Description des termes associés à l'activité de la luciférase dans l'essai IL-8 Luc

Abréviations	Définition
GAPLA	Activité de la luciférase rouge SLR indicative de l'activité du promoteur GAPDH
IL8LA	Activité de la luciférase orange SLO indicative de l'activité du promoteur IL-8
nIL8LA	IL8LA / GAPLA
Ind-IL8LA	nIL8LA des cellules THP-G8 exposées aux produits chimiques / nIL8LA des cellules non exposées
Inh-GAPLA	GAPLA des cellules THP-G8 exposées aux produits chimiques / GAPLA des cellules non exposées

CV05 La plus faible concentration du produit chimique à laquelle Inh-GAPLA est < 0,05.

---

11. Des normes de performance (15) permettent de simplifier la validation d'essais *in vitro* modifiés utilisant des tests IL-8 Luciférase similaires au test IL-8 Luc, et de modifier rapidement la ligne directrice 442E de l'OCDE pour y intégrer ces essais. L'acceptation mutuelle des données (AMD) ne sera garantie que pour les essais validés selon les normes de performance, si ces essais ont été examinés et ajoutés à la ligne directrice 442E par l'OCDE (16).

## DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

12. Avant d'utiliser en routine l'essai décrit dans le présent appendice à la méthode d'essai B.71, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques, en réalisant l'essai sur les dix substances d'épreuve listées à l'appendice 3.3 et conformément aux Bonnes pratiques des méthodes *in vitro* (17). En outre, les utilisateurs de l'essai devront conserver une base de données historiques générées avec les vérifications de réactivité (voir paragraphe 15), avec le témoin positif et avec le témoin de solvant/véhicule (voir paragraphes 21-24), et devront utiliser ces données pour confirmer la reproductibilité de l'essai dans le temps au sein de leur laboratoire.

## PROCÉDURE

13. Le mode opératoire de référence pour l'essai IL-8 Luc est disponible et doit être suivi lors de la mise en œuvre de la méthode d'essai (18). Les laboratoires souhaitant mener cet essai peuvent obtenir la lignée cellulaire recombinante THP-G8 auprès du laboratoire GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japon après signature d'un accord de transfert de matériel, en ligne avec les conditions énoncées dans le modèle OCDE. Les paragraphes qui suivent fournissent une description des principaux composants et protocoles de l'essai.

### Préparation des cellulless

14. Il convient d'utiliser la lignée cellulaire THP-G8 du laboratoire GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japon, pour mener l'essai IL-8 Luc (voir paragraphes 8 et 13). À leur réception, les cellules sont repiquées (2-4 repiquages) et congelées pour être stockées en réserve homogène. Les cellules de cette réserve peuvent être repiquées jusqu'à six semaines, sans dépasser 12 repiquages. Le milieu de culture utilisé pour le repiquage est le RPMI-1640 contenant 10 % sérum bovin fœtal (SBF), une solution d'antibiotique/ antimycosique (100 U/ml pénicilline G, 100 µg/ml streptomycine et 0,25 µg/ml amphotéricine B dans une

solution saline à 0,85 %) (GIBCO Cat#15240-062, par exemple), 0,15 µg/ml puromycine (CAS:58-58-2, par exemple) et 300 µg/ml G418 (CAS:108321-42-2, par exemple).

15. Avant utilisation des cellules pour l'essai, elles doivent être qualifiées par une vérification de réactivité. Cette vérification doit être effectuée une à deux semaines, ou 2 à 4 repiquages, après décongélation, avec comme témoin positif le 4-nitrobenzyle bromure (4-NBB) (CAS:100-11-8, pureté  $\geq 99$  %) et comme témoin négatif l'acide lactique (CAS:50-21-5, pureté  $\geq 85$  %). Le 4-NBB doit générer une réponse positive pour Ind-IL8LA ( $\geq 1,4$ ), l'acide lactique doit générer une réponse négative pour Ind-IL8LA ( $< 1,4$ ). Seules les cellules ayant réussi la vérification de réactivité sont utilisées pour l'essai. La vérification est réalisée suivant la procédure décrite aux paragraphes 22-24.
16. Pendant l'essai, les cellules THP-G8 sontensemencées à une densité de 2 à  $5 \times 10^5$  cellules/ml, puis placées en préculture dans des flacons de culture pendant 48 à 96 heures. Le jour de l'essai, les cellules sont récoltées depuis le flacon de culture et rincées avec du RPMI-1640 contenant 10 % SBF sans antibiotiques, puis suspendues à une densité de  $1 \times 10^6$  cellules/ml dans du RPMI-1640 contenant 10 % SBF sans antibiotiques. Les cellules sont enduites réparties dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (Costar Cat#3603, par exemple) à raison de 50 µl par puits ( $5 \times 10^4$  cellules/puits).

#### **Préparation du produit chimique d'essai et des substances témoin**

17. Les produits chimiques d'essai et les substances témoin sont préparés le jour de l'essai. Dans la méthode IL-8 Luc, les produits chimiques d'essai sont dissous dans du X-VIVO™ 15, un milieu sans sérum disponible dans le commerce (Lonza, 04-418Q), jusqu'à une concentration finale de 20 mg/ml. Le milieu X-VIVO™ 15 est ajouté à 20 mg de produit chimique d'essai (quelle que soit la solubilité du produit chimique) dans un microtube, puis l'on complète pour atteindre un volume de 1 ml, le tube est mélangé vigoureusement et placé sur un mélangeur rotatif à une vitesse maximale de 8 rpm pendant 30 minutes à température ambiante (environ 20°C). De plus, si les produits chimiques solides restent insolubles, le tube est soumis à une sonication jusqu'à dissolution complète du produit chimique ou jusqu'à obtention d'une dispersion stable. Si les produits chimiques sont solubles dans le X-VIVO™ 15, la solution est diluée suivant un facteur 5 dans du X-VIVO™ 15 et utilisée comme solution de base des produits chimiques dans le X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). Si les produits chimiques sont non-solubles dans le X-VIVO™ 15, le mélange est à nouveau mélangé par rotation pendant au moins 30 minutes, puis centrifugé à 15 000 rpm ( $\approx 20\,000$  g) pendant 5 minutes. Le surnageant obtenu est utilisé comme solution de base des produits chimiques dans le X-VIVO™ 15. Si d'autres solvants sont utilisés, par exemple le DMSO, l'eau ou du milieu de culture, les raisons scientifiques de ce choix doivent être expliquées. La procédure détaillée de dilution des produits chimiques est fournie à l'appendice 3.5. Les solutions de X-VIVO™ 15

décrites aux paragraphes 18-23 sont mélangées à 1:1 (v/v) avec les cellules en suspensions préparées dans la plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (voir paragraphe 16).

18. La première épreuve a pour but de déterminer la concentration cytotoxique et d'évaluer le potentiel de sensibilisation cutanée des produits chimiques. Une série de dilutions de facteur 2 des solutions de base des produits chimiques dans le X-VIVO™ 15 est réalisée avec du X-VIVO™ 15 (voir Appendice 3.5), dans une plaque microtitre 96 puits (Costar Cat#EW-01729-03, par exemple). Ensuite, dans chaque puits d'une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat, on ajoute 50 µl de solution diluée à 50 µl de cellules en suspension. En conséquence, pour les produits chimiques d'essai solubles dans le X-VIVO™ 15, la concentration finale de produit chimique se situe dans une fourchette allant de 0,002 à 2 mg/ml (Appendice 3.5). Pour les produits chimiques d'essai non solubles dans le X-VIVO™ 15 à 20 mg/ml, seuls des facteurs de dilution allant de 2 à 2<sup>10</sup> sont prévus, bien que les concentrations finales réelles des produits chimiques d'essai restent approximatives et dépendent de la concentration de saturation des produits chimiques d'essai dans la solution de base X-VIVO™ 15.
19. Dans les épreuves suivantes (réplicats deux, trois et quatre), la solution de base X-VIVO™ 15 est préparée à une concentration quatre fois supérieure à la concentration de viabilité cellulaire 05 (CV05, la concentration la plus faible à laquelle Inh-GAPLA < 0,05) observée lors de la première épreuve. Si la valeur Inh-GAPLA ne baisse pas sous la limite de 0,05 à la plus haute concentration testée dans la première épreuve, la solution de base X-VIVO™ 15 est préparée à la concentration la plus élevée de la première épreuve. La concentration CV05 est calculée en divisant la concentration de la solution de base de la première épreuve par le facteur de dilution de CV05 (X) nécessaire pour diluer la solution de base au point d'atteindre la valeur CV05 (voir Appendice 3.5). Pour tester les substances non solubles dans le X-VIVO à 20 mg/mL, la CV05 est déterminée par la concentration de la solution de base x 1/X. Pour les épreuves 2 à 4, une seconde solution de base est préparée à une concentration de 4 x CV50 (Appendice 3.5).
20. Une série de dilutions des secondes solutions de base de X-VIVO™ 15 est réalisée suivant un facteur 1,5 dans une plaque microtitre 96 puits. Ensuite, dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat, on ajoute 50 µl/puits de la solution diluée à 50 µl/puits de suspension cellulaire. Chaque concentration de chaque produit chimique d'essai est testée dans 4 puits. Les échantillons sont ensuite mélangés sur un agitateur de plaques et incubés pendant 16 heures à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, puis l'activité de la luciférase est mesurée conformément à la procédure décrite ci-dessous. Pour établir une prédiction positive ou négative, il faut avoir testé les produits chimiques d'essai dans 4 épreuves au maximum avec l'essai IL-8 Luc.

21. Le témoin de solvant est un mélange de 50 µl/puits de X-VIVO™ 15 et de 50 µl/puits de suspension cellulaire dans du RPMI-1640 contenant 10 % SBF.
22. Le témoin positif recommandé est le 4-NBB. À 20 mg de 4-NBB placés dans un microtube de 1,5 ml, on ajoute du X-VIVO™ 15 jusqu'à atteindre 1 ml. Le tube est mélangé vigoureusement et placé sur un mélangeur rotatif à une vitesse maximale de 8 rpm pendant au minimum 30 minutes, puis centrifugé à 20 000 g pendant 5 minutes. Le surnageant obtenu est dilué suivant un facteur 4 dans le X-VIVO™ 15, puis 500 µl du surnageant dilué sont transférés dans un puits sur une plaque microtitre 96 puits. Le surnageant dilué est à nouveau dilué dans du X-VIVO™ 15 suivant des facteurs 2 et 4, puis on ajoute 50 µl des solutions à 50 µl de cellules THP-G8 en suspension dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (Appendice 3.6). Chaque concentration du témoin positif est testée dans 4 puits. La plaque microtitre est agitée sur un agitateur de microplaques et incubée dans un incubateur à CO<sub>2</sub> pendant 16 heures (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>), puis l'activité de la luciférase est mesurée conformément à la procédure décrite au paragraphe 29.
23. Le témoin négatif recommandé est l'acide lactique. À 20 mg d'acide lactique placés dans un microtube de 1,5 ml, on ajoute du X-VIVO™ 15 (20 mg/ml) jusqu'à atteindre 1 ml. On dilue la solution d'acide lactique à 20 mg/ml suivant un facteur 5 dans du X-VIVO™ 15 (4 mg/ml), puis 500 µl de cette solution d'acide lactique à 4 mg/ml sont transférés dans un puits sur une plaque microtitre 96 puits. Cette solution est diluée suivant un facteur 2 dans du X-VIVO™ 15, puis re-diluée suivant un facteur 2 pour produire des solutions à 2 mg/ml et 1 mg/ml. On ajoute 50 µl de ces trois solutions et de témoin de véhicule (X-VIVO™ 15) aux cellules THP-G8 dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat. Chaque concentration du témoin négatif est testée dans 4 puits. La plaque microtitre est agitée sur un agitateur de microplaques et incubée dans un incubateur à CO<sub>2</sub> pendant 16 heures (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), puis l'activité de la luciférase est mesurée conformément à la procédure décrite au paragraphe 29.
24. D'autres témoins positifs ou négatifs adaptés peuvent être utilisés si des données historiques sont disponibles pour en dériver des critères d'acceptabilité comparables pour les épreuves.
25. Des précautions doivent être prises contre l'évaporation des produits chimiques d'essai volatiles et pour éviter toute contamination croisée entre puits par les produits chimiques d'essai (en scellant la plaque avant incubation avec les produits chimiques d'essai, par exemple).
26. Pour établir une prédiction positive ou négative, il faut avoir testé les produits chimiques d'essai et le témoin de solvant dans 2 à 4 épreuves (voir Tableau 2). Les épreuves sont réalisées en plusieurs jours distincts, avec des solutions de base des produits chimiques

dans le X-VIVO™ 15 fraîches et des cellules récoltées séparément. Les cellules peuvent être issues du même repiquage.

### **Mesure de l'activité de la luciférase**

27. La luminescence est mesurée à l'aide d'un luminomètre pour microplaques 96 puits équipé de filtres optiques, par exemple les séries Phelios (ATTO, Tokyo, Japon), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Allemagne) ou ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Le luminomètre doit être étalonné pour chaque essai, afin de garantir une bonne reproductibilité des mesures (19). Des luciférases recombinantes orange et rouge sont disponibles pour effectuer l'étalonnage.
28. On transfère 100 µl de réactif pré-chauffé Tripluc® Luciférase (Tripluc) dans chaque puits de la plaque microtitre qui contient la suspension cellulaire traitée avec ou sans produit chimique d'essai. La plaque est agitée pendant 10 minutes à température ambiante (environ 20°C) avant d'être placée dans le luminomètre pour mesurer l'activité de la luciférase. La bioluminescence est mesurée pendant 3 secondes sans filtre optique (F0), puis 3 secondes avec filtre optique (F1). Le recours à d'autres réglages doit être justifié, par exemple pour s'adapter au modèle de luminomètre utilisé.
29. Pour chaque concentration, les paramètres sont calculés à partir des valeurs mesurées, par exemple IL8LA, GAPLA, nIL8La, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, la moyenne avec écart type pour IL8LA, la moyenne avec écart type pour GAPLA, la moyenne avec écart type pour nIL8LA, la moyenne avec écart type pour Ind-IL8LA, la moyenne avec écart type pour Inh-GAPLA et l'intervalle de confiance à 95 % pour Ind-IL8LA. Les définitions des paramètres utilisés dans le présent paragraphe sont fournies aux Appendices I et IV, respectivement.
30. Avant de procéder aux mesures dans un essai à rapporteur multi-couleurs, il convient de réaliser un discernement des couleurs, généralement à l'aide de détecteurs (luminomètre et lecteur de plaque) équipés de filtres optiques tels que des filtres coupe-bande (filtres passe-haut ou passe-bas) ou des filtres passe-bande. Il convient d'étalonner les coefficients de transmission des filtres pour chaque signal coloré bioluminescent avant l'essai, voir Appendice 3.2.

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Évaluation des données**

31. Pour émettre une prédiction positive ou négative, les critères à respecter dans chaque épreuve sont les suivants:

- une prédiction avec l'essai IL-8 Luc est considérée comme positive si un produit chimique d'essai présente une valeur Ind-IL8LA  $\geq 1,4$  et si la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % pour Ind-IL8LA est  $\geq 1,0$
- une prédiction avec l'essai IL-8 Luc est considérée comme négative si un produit chimique d'essai présente une valeur Ind-IL8LA  $< 1,4$  ou si la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95 % pour Ind-IL8LA est  $< 1,0$

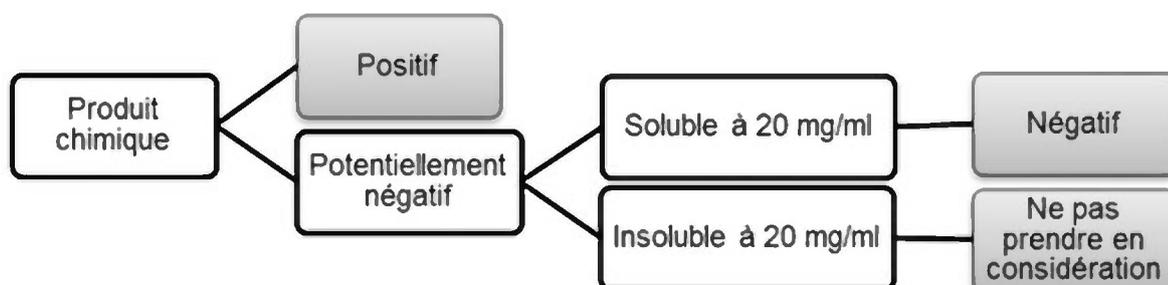
### Modèle prédictif

32. Les produits chimiques d'essai qui donnent deux résultats positifs lors de la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> épreuve sont considérés comme positifs, tandis que ceux qui donnent trois résultats négatifs lors de la 1<sup>ère</sup>, 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> épreuve sont considérés comme potentiellement négatifs (Tableau 2). Parmi les produits chimiques potentiellement négatifs, ceux qui sont dissous à 20 mg/ml dans le X-VIVO™ 15 sont considérés comme négatifs, tandis que ceux qui ne sont pas dissous à 20 mg/ml dans le X-VIVO™ 15 ne sont pas pris en considération (Figure 1).

**Tableau 2:** critères d'identification des produits positifs et potentiellement négatifs

Épreuve 1	Épreuve 2	Épreuve 3	Épreuve 4	Prédiction finale	
Positif	Positif	-	-	Positif	
	Négatif	Positif	-	Positif	
		Négatif	Positif	Positif	Positif
			Négatif	Négatif	Potentiellement négatif
Négatif	Positif	Positif	-	Positif	
		Négatif	Positif	Positif	
			Négatif	Potentiellement négatif	
	Négatif	Positif	Positif	Positif	
		Négatif	Positif	Potentiellement négatif	
			Négatif	-	Potentiellement négatif

**Figure 1:** modèle prédictif pour la décision finale



### Critère d'acceptabilité

33. Les critères d'acceptabilité suivants doivent être remplis lorsque l'essai IL-8 Luc est mené:

- la valeur Ind-IL8LA doit être de 5,0 au minimum à au moins une concentration du témoin positif, 4-NBB, pour chaque essai.
- la valeur Ind-IL8LA doit être de 1,4 au maximum à toutes les concentrations du témoin négatif, l'acide lactique, pour chaque essai.
- il n'est pas tenu compte des données issues de plaques pour lesquelles la valeur GAPLA des puits témoin, contenant des cellules et du Tripluc mais pas de produits chimiques, est inférieure à 5 fois la valeur des puits contenant le milieu d'essai seul (50 µl/puits de RPMI-1640 contenant 10 % SBF et 50 µl/puits de X-VIVO™ 15).
- il n'est pas tenu compte des données issues de plaques pour lesquelles la valeur Inh-GAPLA à toutes les concentrations des produits chimiques d'essai ou des témoins est inférieure à 0,05; dans ce cas, la première épreuve est reproduite de telle sorte que la concentration finale la plus élevée dans le réplicat soit la plus basse concentration finale de l'épreuve précédente.

### Rapport d'essai

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

#### *Produits chimiques d'essai*

Substance mono-constituant:

- Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;

- Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques, selon les données disponibles;
- Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
- Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- Solubilité dans le X-VIVOTM 15. Pour les produits chimiques insolubles dans le X-VIVOTM 15, indiquer si un précipité ou une flottation sont observés après centrifugation;
- Concentration(s) testée(s);
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
- Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai si le X-VIVOTM 15 n'a pas été utilisé.

Substance multi-constituants, UVCB et mélange:

- Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;
- Apparence physique, hydrosolubilité et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
- Masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude;
- Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- Solubilité dans le X-VIVOTM 15. Pour les produits chimiques insolubles dans le X-VIVOTM 15, indiquer si un précipité ou une flottation sont observés après centrifugation;
- Concentration(s) testée(s);
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.
- Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai si le X-VIVOTM 15 n'a pas été utilisé.

### *Témoins*

Témoin positif:

- Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule développée et/ou autres identifiants;
- Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles et s'il y a lieu;
- Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
- Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- Concentration(s) testée(s);
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
- Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.

Témoin négatif:

- Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants;
- Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
- Apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, si des témoins négatifs autres que ceux mentionnés dans la Ligne directrice sont utilisés, et selon les données disponibles;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;
- Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai.

*Conditions d'essai*

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;
- Description de l'essai utilisé;
- Lignée cellulaire utilisée, conditions de stockage et origine (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple);
- Numéro de lot et origine du SBF, nom du fournisseur, numéro de lot de la plaque microtitre noire 96 puits à fond plat, numéro de lot du réactif Tripluc;
- Nombre de repiquages et densité cellulaire au moment de l'essai;
- Méthode de numération cellulaire utilisée pour l'ensemencement avant l'essai et mesures mises en oeuvre pour garantir une répartition homogène des cellules;

- Luminomètre utilisé (modèle, par exemple), y compris réglages de l'instrument, substrat de luciférase utilisé, démonstration de l'adéquation des mesures de luminescence avec les témoins décrits à l'Appendice 3.2;
- Procédure suivie pour la démonstration de la compétence du laboratoire dans l'exécution de l'essai (en testant les substances d'épreuve, par exemple) ou pour la démonstration de la reproductibilité de l'essai dans le temps.

#### *Mode opératoire*

- Nombre de réplicats et d'épreuves;
- Concentration des produits chimiques d'essai, procédure d'application et durée d'exposition (si celles-ci diffèrent des recommandations);
- Description des critères d'évaluation et de décision appliqués;
- Description des critères d'acceptabilité de l'étude utilisés;
- Description de toutes modifications apportées au mode opératoire.

#### *Résultats*

- Mesures de IL8LA et GAPLA;
- Calculs de nIL8LA, Ind-IL8LA et Inh-GAPLA;
- Intervalle de confiance à 95 % pour Ind-IL8LA;
- Graphique présentant les courbes dose-effet pour l'induction de l'activité de la luciférase et la viabilité;
- Description de toute autre observation pertinente, s'il y a lieu.

#### *Discussion des résultats*

- Discussion des résultats obtenus avec l'essai IL-8 Luc;
- Examen des résultats de l'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres informations pertinentes sont disponibles.

#### *Conclusion*

**BIBLIOGRAPHIE**

- (1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci* 124:359-69.
- (2) OCDE (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Série sur les essais et évaluations N° 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (3) OCDE (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Série sur les essais et évaluations N° 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (4) OCDE (2016) Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Série sur les essais et évaluations N° 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse suivante: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- (5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. *Regul Toxicol Pharmacol* 69:371-9.
- (6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol In Vitro* 29:1816-30.
- (7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul Toxicol Pharmacol* 71:337-51.
- (8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative

evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

- (9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.
- (10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.
- (11) OCDE (2016). Ligne directrice N° 455: Ligne directrice axée sur la performance pour les essais *in vitro* de transactivation par transfection stable visant la détection des substances agonistes et antagonistes des récepteurs des oestrogènes, Publications de l'OCDE, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en>.
- (12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.
- (13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.
- (14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.
- (15) OCDE (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations. OCDE, Paris, France.
- (16) OCDE (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations N° 34. OCDE, Paris, France.
- (17) OCDE (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organisation de coopération

et de développement économiques, , Paris. Disponible à l'adresse suivante:  
[http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD\\_Final\\_Draft\\_GIVIMP.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD_Final_Draft_GIVIMP.pdf).

- (18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Available at.  
[http://www.jacvam.jp/en\\_effort/effort02.html](http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html).
- (19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem Photobiol* 86:1046-9.
- (20) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations N° 168. OCDE, Paris, France.
- (21) Nations unies (2015). Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques dangereux (SGH). Sixième édition révisée. New York & Genève: United Nations Publications. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponible à l'adresse suivantes:  
[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_f.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html).

### Appendice 3.1

#### DÉFINITIONS

**Précision:** étroitesse de l'accord entre les résultats de l'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de l'essai et l'un des aspects de sa «pertinence». Ce terme est souvent utilisé au sens de «concordance», pour qualifier la proportion de résultats corrects d'un essai (16).

**AOP (Adverse Outcome Pathway, voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables):** séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable *in vivo*, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques similaires et de l'événement initiateur au niveau moléculaire (20).

**Produit chimique:** une substance ou un mélange.

**CV05:** viabilité cellulaire 05. Concentration minimale à laquelle les produits chimiques génèrent une valeur Inh-GAPLA inférieure à 0,05.

**FInSLO-LA:** abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL-8 Luc, faisant référence à Ind-IL8LA. Voir définition de Ind-IL8LA.

**GAPLA:** activité de la luciférase rouge *Stable Luciferase Red* (SLR) (max = 630 nm), sous régulation du promoteur de GAPDH, qui démontre la viabilité cellulaire et le nombre de cellules viables.

**Danger:** propriété intrinsèque d'un agent ou situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

**IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment, approches intégrées en matière d'essais et d'évaluation):** approche structurée utilisée dans l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou dans l'évaluation de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les données pertinentes dans le but d'informer une décision réglementaire sur le danger potentiel et/ou le risque et/ou le besoin d'effectuer d'autres tests ciblés.

**II-SLR-LA:** abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL-8 Luc, faisant référence à Inh-GAPLA. Voir définition de Inh-GAPLA.

**IL-8 (Interleukine-8):** cytokine issue des cellules endothéliales, fibroblastes, kératinocytes, macrophages et monocytes qui provoque la chimiotaxie des neutrophiles et des lymphocytes T.

**IL8LA:** activité de la luciférase orange *Stable Luciferase Orange* (SLO) $\lambda$  (max = 580 nm), sous régulation du promoteur de IL-8.

**Ind-IL8LA:** variation d'induction d'IL8LA. Calculée en divisant la valeur nIL8LA des cellules THP-G8 traitées avec les produits chimiques par la valeur nIL8LA des cellules THP-G8 non stimulées, elle représente l'induction du promoteur IL-8 par les produits chimiques.

**Inh-GAPLA:** inhibition de GAPLA. Calculée en divisant la valeur GAPLA des cellules THP-G8 traitées avec les produits chimiques par la valeur GAPLA des cellules THP-G8 non stimulées, elle représente la cytotoxicité des produits chimiques.

**Seuil minimal d'induction (MIT):** la concentration minimale à laquelle un produit chimique remplit le critère de positivité.

**Mélange:** mélange ou solution constitué(e) d'au moins deux substances.

**Substance mono-constituant:** substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

**Substance multi-constituants:** substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent dans une concentration  $\geq 10$  % (m/m) et  $< 80$  % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

**nIL8LA:** l'activité de SLO qui reflète l'activité du promoteur IL-8 (IL8LA) normalisée par l'activité de la SLR qui reflète l'activité du promoteur GAPDH (GAPLA). Elle représente l'activité du promoteur IL-8 rapportée à la viabilité cellulaire ou au nombre de cellules.

**nSLO-LA:** abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL-8 Luc, faisant référence à nIL8LA. Voir définition de nIL8LA.

**Témoin positif:** réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

**Pré-haptènes:** produits chimiques devenant sensibilisants suite à une transformation abiotique.

**Pro-haptènes:** produits chimiques acquérant un pouvoir sensibilisant pour la peau suite à une activation enzymatique.

**Pertinence:** décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation

de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) de l'essai (16).

**Fiabilité:** indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'un essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et la répétabilité intra-laboratoire (16).

**Épreuve:** consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un solvant/véhicule et à un témoin positif.

**Sensibilité:** proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'un essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence de l'essai (16).

**SLO-LA:** abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL-8 Luc, faisant référence à IL8LA. Voir définition de IL8LA.

**SLR-LA:** abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes sur l'essai IL-8 Luc, faisant référence à GAPLA. Voir définition de GAPLA.

**Témoin de solvant/véhicule:** échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, excepté le produit chimique d'essai, mais comprenant le solvant /véhicule utilisé. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous ou en dispersion stable dans le même solvant/véhicule. Testé simultanément avec un témoin avec milieu, cet échantillon indique également si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

**Spécificité:** proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'un essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence de l'essai (16).

**Substance:** élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un procédé de production, y compris tout additif nécessaire pour préserver leur stabilité ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité de la substance ni modifier sa composition.

**Surfactant:** aussi appelé agent de surface, il s'agit d'une substance, par exemple un détergent, qui réduit la tension de surface d'un liquide et lui permet ainsi de former une mousse ou de pénétrer dans des solides. Aussi appelé agent mouillant. (LD 437)

**Produit chimique d'essai:** toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode.

**THP-G8:** lignée cellulaire rapporteur IL-8 utilisée dans l'essai IL-8 Luc. La lignée monocyttaire humaine THP-1 a été transfectée avec les gènes de la luciférase SLO et SLR sous le contrôle des promoteurs IL-8 et GAPDH, respectivement.

**SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations unies):** Système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (21).

**UVCB:** substance de composition inconnue ou variable, produit réactionnel complexe et matériaux biologiques.

**Essai valide:** essai dont la pertinence et la fiabilité sont jugées satisfaisantes pour des fins spécifiques, et qui repose sur des principes scientifiquement valables. Un essai n'est jamais valide dans l'absolu, mais seulement par rapport à une fin particulière.

## Appendice 3.2

### **PRINCIPES DE MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA LUCIFÉRISE ET DÉTERMINATION DES COEFFICIENTS DE TRANSMISSION DES FILTRES OPTIQUES POUR SLO ET SLR**

Le système d'essai à rapporteur multiple – Tripluc – peut être utilisé avec un luminomètre à microplaque doté d'un système de détection multi-couleurs avec filtre optique (Phelios AB-2350 [ATTO], ARVO [PerkinElmer] ou Tristar LB941 [Berthold], par exemple). Le filtre optique utilisé pour les mesures est un filtre passe-haut ou passe-bas 600-620 nm, ou un filtre passe-bande 600-700 nm.

#### **Mesure de deux couleurs de luciférase avec un filtre optique.**

L'exemple ci-dessous est réalisé avec un appareil Phelios AB-2350 (ATTO). Le luminomètre est équipé d'un filtre passe-haut 600 nm (R60 HOYA Co.) (filtre 1) pour séparer la luminescence SLO ( $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$ ) de la luminescence SLR ( $\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$ ).

Afin d'établir les coefficients de transmission du filtre passe-haut 600 nm, il convient d'abord d'utiliser des enzymes luciférases SLO et SLR purifiées pour i) mesurer l'intensité de la bioluminescence SLO et SLR en l'absence de filtre (F0), ii) mesurer l'intensité de bioluminescence de SLO et SLR qui traverse le filtre 1 (passe-haut 600 nm) et iii) calculer les coefficients de transmission du filtre 1 (600 nm) pour SLO et SLR présentés ci-dessous.

Coefficients de transmission		Abréviation	Définition
SLO	Filtre 1 coefficients de transmission	$\kappa_{O_{R60}}$	Coefficient de transmission du filtre pour SLO
SLR	Filtre 1 coefficients de transmission	$\kappa_{R_{R60}}$	Coefficient de transmission du filtre pour SLR

Si l'intensité de SLO et SLR dans l'échantillon testé sont appelées O et R, respectivement, alors i) l'intensité lumineuse sans filtre (tout optique) F0 et ii) l'intensité lumineuse transmise à travers le filtre 1 (600 nm) F1 sont décrites ci-dessous.

$$F0=O+R$$

$$F1=\kappa_{O_{R60}} \times O + \kappa_{R_{R60}} \times R$$

Ces formules peuvent être expliquées comme suit:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

Ensuite, à partir des coefficients de transmission calculés ( $\kappa O_{R60}$  et  $\kappa R_{R60}$ ) et des valeurs F0 et F1 calculées, il est possible de trouver les valeurs O et R selon le calcul ci-après:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

## Matériel et méthode de détermination du facteur de transmission

### (1) Réactifs

Enzymes de luciférase purifiées:

Enzyme SLO purifiée lyophilisée

Enzyme SLR purifiée lyophilisée

(dans l'étude de validation, les enzymes ont été acquises auprès de GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japon, de même que la lignée cellulaire THP-G8)

Réactif:

Réactif Tripluc<sup>®</sup> Luciférase (obtenu par exemple auprès de TOYOBO Cat#MRA-301)

Milieu: pour le test de luciférase (30 ml, stocké à 2 - 8°C)

Réactif	Concentration	Concentration finale dans le milieu	Volume nécessaire
RPMI-1640	-	-	27 ml
SBF	-	10 %	3 ml

### (2) Préparation des solutions enzymatiques

Dissoudre les enzymes purifiées lyophilisées de luciférase dans un tube en ajoutant 200 µl de 10 ~ 100 mM Tris/HCl ou Hepes/HCl (pH 7,5 ~ 8,0) supplémenté avec 10 % (m/v) glycérol, subdiviser la solution enzymatique en aliquotes en 10 µl dans des tubes jetables de 1,5 ml et stocker les tubes congelés à -80°C. Les solutions enzymatiques congelées peuvent être utilisées pendant au maximum six mois. Pour utiliser les solutions, ajouter 1 ml du milieu de l'essai de luciférase (RPMI-1640 avec 10 % SBF) à chaque tube de solution enzymatique (solution diluée) et maintenir les tubes sur la glace pour éviter toute désactivation.

### (3) Mesure de la bioluminescence

Décongeler le réactif de l'essai de luciférase Tripluc® (Tripluc) et le maintenir à température ambiante dans un bain marie ou sur la paillasse. Allumer le luminomètre 30 minutes avant le début des mesures, afin de permettre au photomultiplicateur de se stabiliser. Transférer 100 µl de la solution enzymatique diluée dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (échantillon de référence SLO en #B1, #B2, #B3, échantillon de référence SLR en #D1, #D2, #D3). Transférer ensuite 100 µl de Tripluc préchauffé dans chaque puits de la plaque contenant la solution enzymatique diluée à l'aide d'une pipette automatique. Agiter la plaque pendant 10 minutes à température ambiante (environ 25°C) sur un agitateur de plaque. Éliminer les bulles qui pourraient se former dans les solutions. Placer la plaque dans le luminomètre pour mesurer l'activité de la luciférase. La bioluminescence est mesurée pendant 3 secondes en l'absence de filtre optique (F0) et 3 secondes avec filtre optique (F1).

Les coefficients de transmission du filtre optique sont calculés comme suit:

Coefficient de transmission (SLO ( $\kappa_{OR60}$ ))= (#B1 de F1+ #B2 de F1+ #B3 de F1) / (#B1 de F0+ #B2 de F0+ #B3 de F0)

Coefficient de transmission (SLR ( $\kappa_{R60}$ ))= (#D1 de F1+ #D2 de F1+ #D3 de F1) / (#D1 de F0+ #D2 de F0+ #D3 de F0)

Les facteurs de transmission calculés sont utilisés pour toutes les mesures réalisées avec le même luminomètre.

### **Contrôle de la qualité du matériel**

Il convient de suivre la procédure décrite dans le mode opératoire IL-8 Luc (18).

### Appendice 3.3

#### SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Avant d'utiliser en routine l'essai décrit dans le présent appendice à la méthode d'essai B.71, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en obtenant la prédiction attendue avec l'essai IL-8 Luc pour les 10 substances recommandées au tableau 1 et en obtenant des valeurs compatibles avec les plages de référence respectives d'au moins 8 substances d'épreuve sur 10 (substances retenues pour représenter l'éventail de réponses possibles au danger de sensibilisation cutanée). Les autres critères étaient la disponibilité des substances dans le commerce, ainsi que la disponibilité de données de référence *in vivo* et de données *in vitro* de grande qualité générées avec la méthode IL-8 Luc. Des données de référence publiées pour la méthode IL-8 Luc sont par ailleurs disponibles (1) (6).

**Tableau 1:** substances recommandées pour démontrer les compétences techniques relatives à la méthode IL-8 Luc

Substances d'épreuve de compétence	N°CAS .	État	Solubilité dans le X-VIVO15 à 20 mg/ml	Prédiction <i>In vivo</i> <sup>1</sup>	Prédiction IL-8 Luc <sup>2</sup>	Plage de référence (µg/ml) <sup>3</sup>	
						CV05 <sup>4</sup>	IL-8 Luc MIT <sup>5</sup>
2,4-Dinitrochlorobenzène	97-00-7	Solide	Insoluble	Sensibilisant (extrême)	Positif	2.3-3.9	0.5-2.3
Formaldéhyde	50-00-0	Liquide	Soluble	Sensibilisant (fort)	Positif	9-30	4-9
Mercapto-2-benzothiazole	149-30-4	Solide	Insoluble	Sensibilisant (modéré)	Positif	250-290	60-250
Éthylènediamine	107-15-3	Liquide	Soluble	Sensibilisant (modéré)	Positif	500-700	0.1-0.4
Éthylèneglycol diméthacrylate	97-90-5	Liquide	Insoluble	Sensibilisant (faible)	Positif	> 2000	0.04-0.1
p-allylanisole (Estragol)	140-67-0	Liquide	Insoluble	Sensibilisant (faible)	Positif	> 2000	0.01-0.07
Sulphate de Streptomycine	3810-74-0	Solide	Soluble	Non sensibilisant	Négatif	> 2000	> 2000
Glycérol	56-81-5	Liquide	Soluble	Non sensibilisant	Négatif	> 2000	> 2000
Isopropanol	67-63-0	Liquide	Soluble	Non sensibilisant	Négatif	> 2000	> 2000

Abréviations: N°CAS = Numéro d'enregistrement au *Chemical Abstracts Service*

<sup>1</sup> La puissance *in vivo* est obtenue d'après les critères proposés par l'ECETOC (19).

<sup>2</sup> Basée sur les valeurs historiques observées (1) (6).

<sup>3</sup> Les valeurs CV05 et IL-8 Luc MIT ont été calculées à partir de l'hydrosolubilité indiquée par le logiciel EPI Suite™.

<sup>4</sup> CV05: concentration minimale à laquelle les produits chimiques génèrent une valeur Inh-GAPLA inférieure à 0,05.

<sup>5</sup> MIT: concentration la plus faible à laquelle un produit chimique répond aux critères de positivité.

### Appendice 3.4

#### INDICES ET CRITÈRES DE JUGEMENT

##### **nIL8LA (nSLO-LA)**

Les réplicats  $j$  ( $j = 1$  à  $4$ ) des concentrations  $i$  ( $i = 0$  à  $11$ ) sont mesurées pour IL8LA (SLO-LA) et pour GAPLA (SLR-LA), respectivement. La valeur IL8LA normalisée, appelée nIL8LA (nSLO-LA), est définie comme suit:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Il s'agit de l'unité de mesure de base pour cet essai.

##### **Ind-IL8LA (FInSLO-LA)**

La hausse moyenne de la valeur nIL8LA (nSLO-LA) pour le réplicat à une concentration  $i$  par rapport à la concentration 0, Ind-IL8LA, est la mesure principale de l'essai. Le calcul du ratio s'effectue grâce à la formule qui suit:

$$\text{Ind-IL8LA}_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j nIL8LA_{0j} \right\}$$

Le laboratoire principal suggère de retenir une valeur de 1,4 comme seuil de positivité pour le produit chimique d'essai. Cette valeur s'appuie sur l'étude des données historiques du laboratoire principal. L'équipe de gestion des données a ensuite utilisé cette valeur dans toutes les phases de l'étude de validation. Le principal résultat, Ind-IL8LA, est le ratio de deux moyennes arithmétiques comme détaillé dans l'équation.

##### **Intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %)**

La précision de mesure du résultat principal est estimée grâce à l'intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %) du ratio. Le seuil inférieur de l'IC 95 %  $\geq 1$  indique que la valeur nIL8LA à l'une des concentrations  $i$  est significativement supérieure à la valeur obtenue avec le témoin de solvant. L'IC 95 % peut être calculé de plusieurs manières. Dans la présente étude, la méthode dite du théorème de Fieller a été utilisée. Selon ce théorème, l'intervalle de confiance à 95 % est calculé comme suit:

$$\left[ \frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \right],$$

où

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}, \quad B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}, \quad C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ et } n_0 = 4,$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \sum_j nIL8LA_{0j}, \quad sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \bar{x}_0)^2,$$

$$n_{yi} = 4, \quad \bar{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij}), \quad sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yi} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \bar{y}_i)^2.$$

$t_{0,975(v)}$  est le rang centile 97,5 dans la distribution centrée de Student, avec le  $v$  du degré de liberté, où

$$v = \left( \frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / \left\{ \left( \frac{sd_0^2}{n_0} \right)^2 / (n_0 - 1) + \left( \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}} \right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

### **Inh-GAPLA (II-SLR-LA)**

La valeur Inh-GAPLA est le ratio de la valeur GAPLA moyenne (SLR-LA) pour le réplicat à une concentration  $i$  comparée à la valeur obtenue avec le témoin de solvant, calculée suivant l'équation ci-après

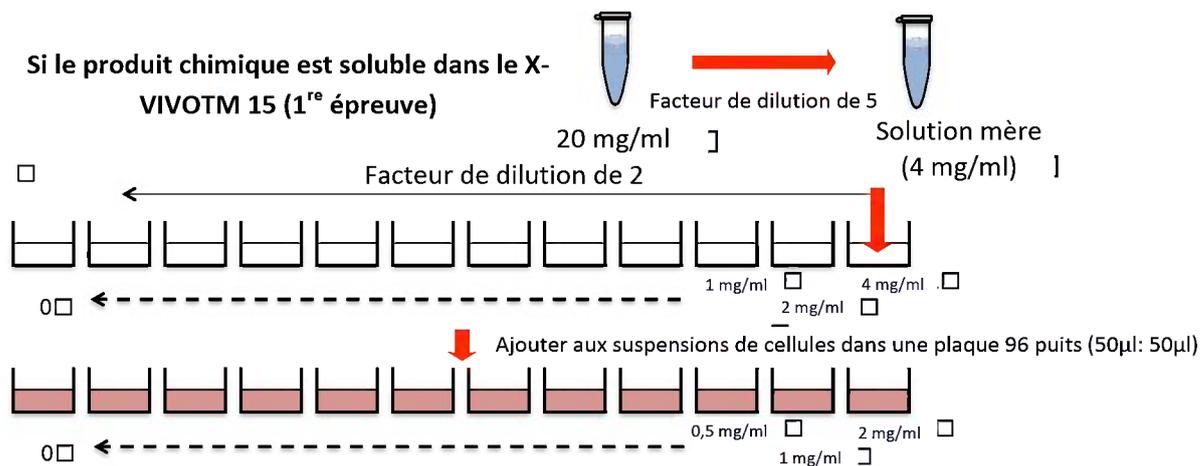
$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

La valeur GAPLA étant placée en dénominateur du calcul de nIL8LA, si GAPLA est très faible, la variation de nIL8LA est très grande. En conséquence, les valeurs Ind-IL8LA pour une très faible valeur Inh-GAPLA (inférieure à 0,05) doivent être considérées comme peu précises.

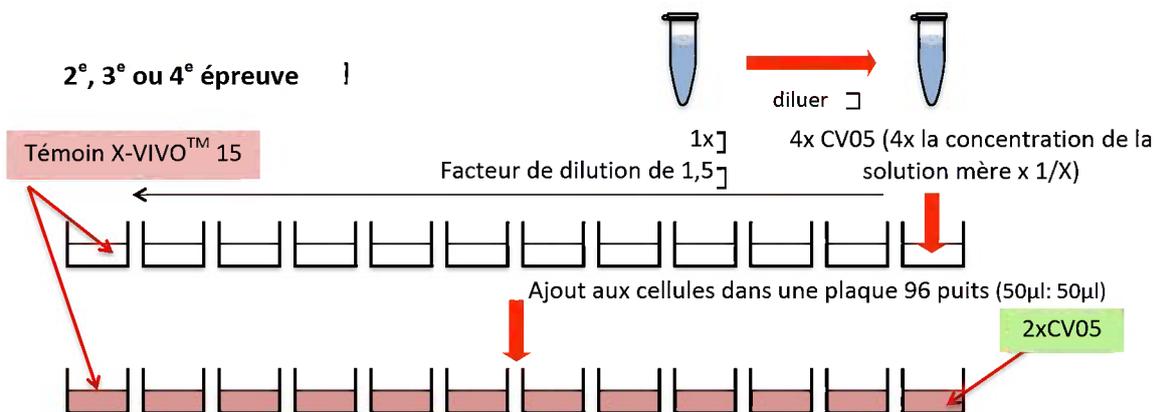
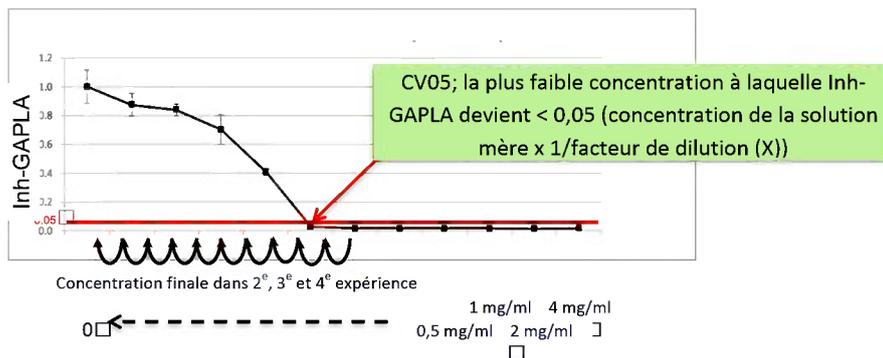
### Appendice 3.5

## SCHEMA DU MODE OPERATOIRE POUR LA DISSOLUTION DES PRODUITS CHIMIQUES DE L'ESSAI IL-8 LUC.

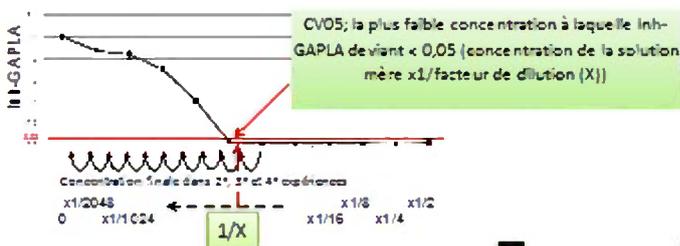
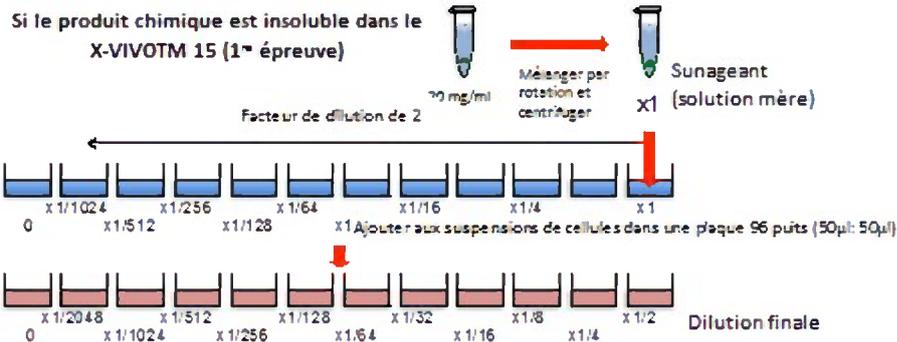
(a) Pour les produits chimiques dissous dans le X-VIVO™ 15 à raison de 20 mg/ml



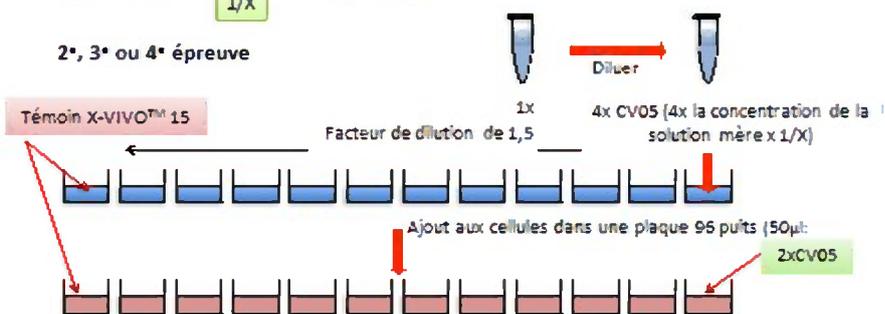
Déterminer la concentration la plus élevée dans les expériences suivantes



(b) Pour les produits chimiques insolubles dans le X-VIVO™ 15 à 20 mg/ml



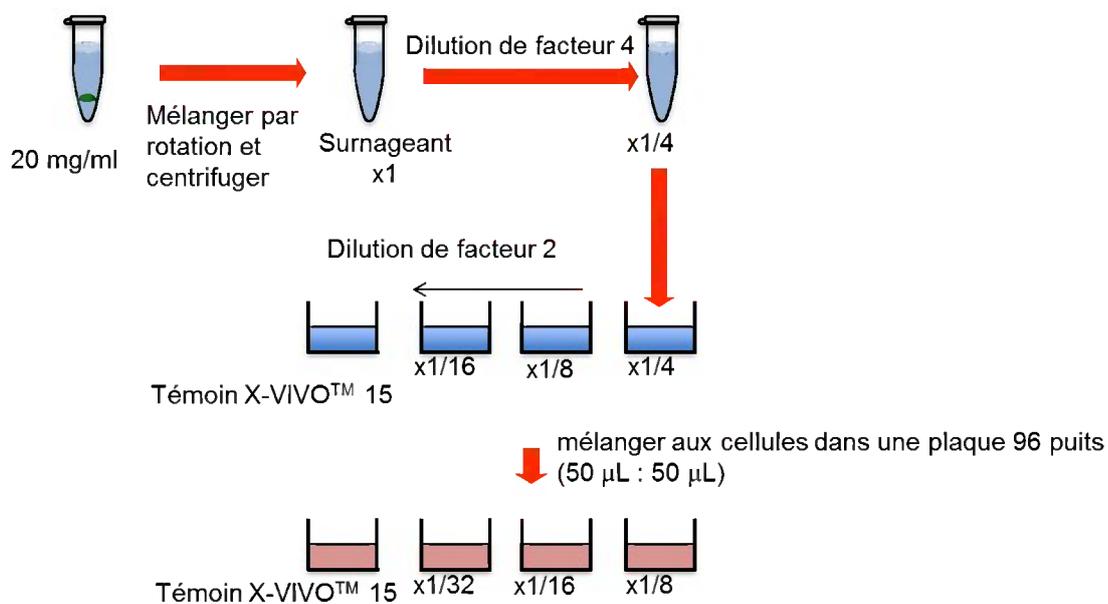
**2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> épreuve**



### Appendice 3.6

#### **SCHEMA DE LA METHODE DE DISSOLUTION DU 4-NBB POUR LE TEMOIN POSITIF DE L'ESSAI IL-8 LUC.**

Témoin positif: 4-NBB (insoluble dans le X-VIVO™ 15)



(9) Dans la partie C, les chapitres suivants sont ajoutés:

## «C.52 ÉTUDE ÉTENDUE DE TOXICITE POUR LA REPRODUCTION SUR UNE GENERATION CHEZ MEDAKA (MEOGRT)

### INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice (LD) 240 (2015) de l'OCDE. L'étude étendue sur une génération chez médaka (*Medaka Extended One Generation 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 l'essai MEOGRT 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 méthode d'essai 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). Cette méthode d'essai peut être utilisée 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 pour cette méthode d'essai en raison de la brièveté de son cycle de vie et de la possibilité de déterminer son sexe génétique (2), qui est un élément clé pour cette méthode. Les méthodes et effets observés spécifiques décrits dans la présente méthode d'essai 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 méthode d'essai. 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 d'essai 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 méthode d'essai sont données à l'appendice 1.

## REMARQUES PRELIMINAIRES ET LIMITES

3. Étant donné le nombre limité de produits chimiques d'essais 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 méthode d'essai 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 pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (3). La méthode d'essai commence par l'exposition de poissons adultes (génération F0) au produit chimique d'essai 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 sur le plan structurel que sur celui de l'activation. 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.
4. 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 appendice 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 l'essai 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).

5. La méthode d'essai a été conçue pour permettre la mise en évidence des effets d'une seule substance. Cependant, si un essai doit être réalisé sur un mélange, il convient de vérifier si les résultats seront acceptables dans le cadre réglementaire imposé.
6. Avant d'entamer l'essai, il est important de disposer d'informations sur les propriétés physico-chimiques du produit chimique d'essai, afin notamment de s'assurer de la stabilité des solutions de ce produit. Il est aussi nécessaire de maîtriser une méthode analytique suffisamment sensible permettant de vérifier les concentrations du produit chimique d'essai.

### **PRINCIPE DE L'ESSAI**

7. 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 d'essai 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**

8. 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. La fertilité de tous les œufs produits durant l'évaluation est supérieure à 80 %. 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;
  - Le taux d'éclosion des œufs est  $\geq 80$  % (en moyenne) chez les témoins (dans chacune des générations F1 et F2);

- La survie après éclosion jusqu'à 3 spf et de 3 spf jusqu'à l'euthanasie pour la génération F1 (soit 15 spf) est  $\geq 80\%$  (en moyenne) et  $\geq 90\%$  (en moyenne) respectivement chez les témoins (F1);
- Les données disponibles démontrent que la concentration du produit chimique d'essai 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).

9. 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 36 et 38 et l'[appendice 9](#)). En outre, on doit observer au moins une survie post-éclosion minimale ( $\sim 20\%$ ) 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.
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 [appendice 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 d'essai, 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 ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , 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'appendice 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.

### **Systeme 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 constituera par exemple un système d'exposition adapté (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

### **Solutions d'essai**

14. Une solution mère du produit chimique d'essai 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 m/min), selon la stabilité du produit chimique d'essai 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 d'essai 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 d'essai 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 bas 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 méthode d'essai 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 39).

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 (chapitre C.1 de la présente annexe), l'essai de reproduction à court terme chez les poissons (chapitre C.48 de la présente annexe) et d'autres méthodes d'essai, comme les chapitres C.15, C.37, C.41, C.47 ou C.49 de la présente annexe (21) (22) (23) (24) (25) (26) 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  $1/10^{\circ}$  de la CL50 à 96 h (27). 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 d'essai entre niveaux de traitement adjacents est  $\leq 3,2$ .

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

23. Il convient d'utiliser un minimum de six enceintes réplicats par concentration d'essai (voir [appendice 7](#)). Pendant la phase de reproduction (excepté pour la génération F0), la

structure de réplification est doublée pour l'évaluation de la fécondité et chaque réplikat comporte un seul couple reproducteur (voir paragraphe 42).

24. Outre la série de concentrations du produit chimique d'essai, 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 réplikat doit être doublé pour les témoins, afin de garantir la puissance statistique requise (au moins douze réplikats devront être utilisés pour les témoins). Durant la phase de reproduction, le nombre de réplikats est doublé chez les témoins (soit 24 réplikats au minimum, chaque réplikat ne comportant qu'un seul couple reproducteur). Après la reproduction, les réplikats témoins ne doivent pas contenir plus de 20 embryons (poissons).

## **PROCÉDURE**

### **Début de l'essai**

25. 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).
26. Les couples mâle-femelle répondant aux spécifications ci-dessus sont placés par couples individuels dans les cuves destinées à recevoir les réplikats, soit douze réplikats chez les témoins et six réplikats 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 réplikat (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**

27. On trouvera à l'appendice 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.
28. 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 réplikats 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**

29. 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 34). 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'appendice 9.

### **Régime alimentaire**

30. 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'appendice 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**

31. 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 d'essai 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.

32. 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 d'essai 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'adapter le taux de renouvellement de la solution d'essai dans chaque cuve afin que les concentrations d'essai restent aussi constantes que possible.

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

33. 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 *vgt*) 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 41). Le délai de ponte est également évalué. 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. La présente méthode d'essai 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.
34. L'objectif premier de cette méthode d'essai est d'évaluer les effets potentiels au niveau d'une population d'un produit chimique d'essai. 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***

35. 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*

36. 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.
37. 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 (appendices 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 d'essai) 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*

38. 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 (appendice 9). 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.
39. 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 (appendice 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*

40. 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 (29). 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).
41. 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 (30) (31). 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'appendice 9 du chapitre C.41 de la présente annexe ou les appendices 3 et 4 dans (29)).

#### *Mise en place des couples reproducteurs*

42. 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 d'essai. 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*

43. 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*

44. 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 les procédures recommandées pour médaka à l'appendice 6 du chapitre C.48 de la présente annexe). 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 (29). 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*

45. 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'appendice 8. 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**

46. 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 et viables au moment du comptage. Le comptage doit intervenir dès que possible après la récolte.
47. 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 fertiles 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*

48. 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 appendice 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*

49. Chaque poisson fait l'objet d'une évaluation histopathologique à la recherche de pathologies du tissu gonadique (29) (30). Comme on l'a vu au paragraphe 33, 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 de l'EPA (29). 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 Cochran-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*

50. L'essai 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 voies à médiation endocrine. 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 jusqu'à la sélection des poissons (semaine d'essai 6/7), la survie après la sélection jusqu'au prélèvement subadulte (9-10 spf) et la survie depuis la constitution des couples jusqu'au prélèvement de poissons adultes.

**Tableau 1:** Effets mesurés dans l'essai MEOGRT\*

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

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

## DÉROULEMENT CHRONOLOGIQUE

51. Le tableau 2 illustre le déroulement chronologique de l'essai. L'essai 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'appendice 9 récapitule les différentes étapes du début à la fin de l'essai MEOGRT.

**Tableau 2:** Chronologie de l'exposition et des effets mesurés au cours de l'essai 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
<b>Stade de la vie</b>					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
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plan expérimental: 7 groupes de réplicats <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 5 traités par le produit chimique d'essai</li> <li>○ 2 témoins (4 si un solvant est utilisé)</li> </ul> </li> <li>• Plan intragroupe <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 12 réplicats pour la reproduction, la pathologie adulte et les CSS (sem. 10 à 18)</li> <li>○ 6 réplicats pour l'éclosion, la survie, la Vtg ; et CSS et croissance subadultes (sem. 1 à 9)</li> </ul> </li> </ul> <p>CSS: caractères sexuels secondaires ; sem.: semaines; Vtg: vitellogénine</p>																			

## RÉSULTATS ET RAPPORT

### Analyse statistique

52. 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* (32)). L'appendice 10 fournit des orientations pour l'analyse statistique.

53. La conception de l'essai et le choix des tests statistiques doivent assurer la puissance requise pour permettre de détecter les changements d'importance biologique concernant les effets pour lesquels une CSEO doit être établie (32). 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'appendice 10 un ordiogramme 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.

54. 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).
55. Pour la fécondité, le décompte des œufs a lieu chaque jour, mais peut être analysé dans sa globalité ou comme une mesure répétée. L'appendice 10 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 (33).
56. 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*

57. 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 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*

58. 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. 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 d'essai 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**

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

*Produit chimique d'essai: : 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, UVCB et mélanges:

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

*Espèce soumise à l'essai:*

- Nom scientifique, souche (si possible), origine 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 d'essai: 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 d'essai 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, 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 présente méthode d'essai et aux critères d'acceptation, et considérations relatives aux conséquences susceptibles d'en découler pour les résultats de l'essai.

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

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2012a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations (N° 171), Organisation de coopération et de développement économiques, 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 (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations (N° 150), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (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. (2006a). 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. (2006b). 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: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html>.
- (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 (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations (N° 23), Organisation de coopération et de développement économiques, 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. *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) Chapitre C.15 de la présente annexe, Poisson, essai de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin.

- (22) Chapitre C.37 de la présente annexe , Essai de 21 jours sur les Poissons: essai de dépistage à court terme de l'activité oestrogénique et androgénique, et de l'inhibition de l'aromatase.
- (23) Chapitre C.41 de la présente annexe, Essai de développement sexuel des poissons.
- (24) Chapitre C.48 de la présente annexe, Essai à court terme de reproduction des poissons.
- (25) Chapitre C.47 de la présente annexe , Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie.
- (26) Chapitre C.49 de la présente annexe, Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire.
- (27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Vivo* Endocrine Screening Assays. *Chemosphere* 92: 1067-1076.
- (28) 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.
- (29) OCDE (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Série sur les essais et évaluations (N° 227), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. *Genetics* 163: 245–251.
- (31) 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.
- (32) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (Les annexes de cette publication constituent un document à part ), Publications de l'OCDE, Paris.
- (33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33: 1108-1116.

## Appendice 1

### DÉFINITIONS

**Produit chimique:** une substance ou un mélange.

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

**Fécondité** = nombre d'œufs.

**Fertilité** = nombre d'œufs viables/fécondité;

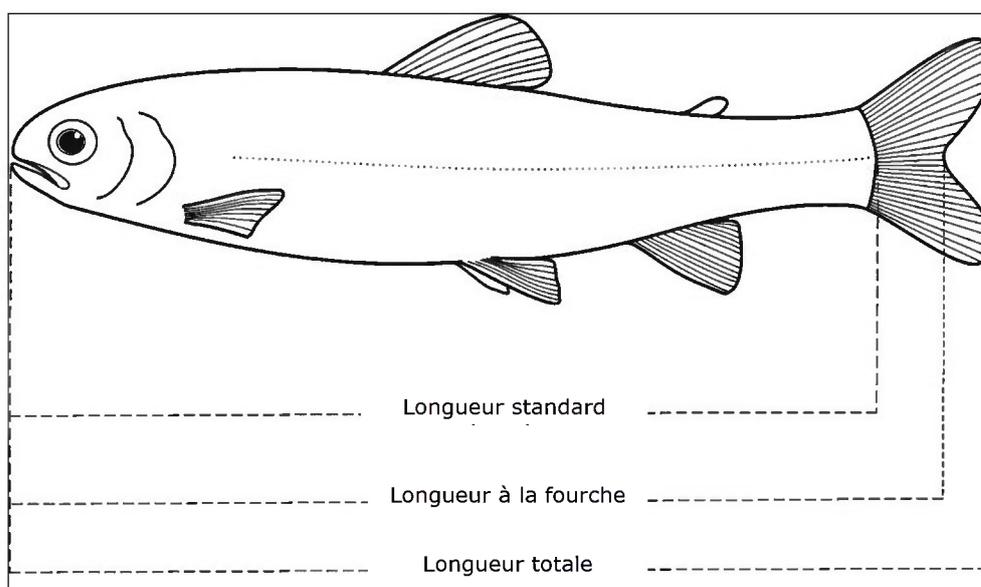
**Longueur à la fourche (LF):** longueur mesurée de l'extrémité du museau à l'extrémité du rayon central de la nageoire caudale, utilisée lorsqu'il est difficile de dire où se termine la colonne vertébrale du poisson ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org)).

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

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

**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)).



**Figure 1:** Description des différentes longueurs utilisées

**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.

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

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

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

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

**Concentration minimale avec effet observé (CMEO):** concentration la plus basse d'un produit chimique d'essai 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 appendices 5 et 6 donnent des indications à ce sujet.

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

**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.

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

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

**Produit chimique d'essai:** toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode.

**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.

**SPF:** semaine post-fécondation

## Appendice 2

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

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

### Appendice 3

#### CONDITIONS D'ESSAI POUR LE MEOGRT

1. Espèce recommandée	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)  16 h de lumière pour 8 h d'obscurité
6. Taux de charge	F0: 2 adultes/réplicat ; F1: démarrage avec au maximum 20 œufs (embryons)/réplicat, réduit à 12 embryons/réplicat 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 réplicat	F0: 2 poissons (couple mâle et femelle) ; F1: maximum 20 poissons (œufs)/réplicat (produits par les couples reproducteurs F0 et F1)
11. Nombre de traitements	5 traitements par le produit chimique d'essai plus témoin(s) approprié(s)
12. Nombre de réplicats par traitement	Minimum de 6 réplicats par traitement pour le produit chimique d'essai et minimum de 12 réplicats pour le témoin, ainsi que pour le témoin avec solvant le cas échéant (le nombre de réplicats est doublé pendant la phase de reproduction à la génération F1)
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-éleuthéro-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'appendice 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



## Appendice 4

### **VALEURS GÉNÉRALEMENT 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 (*vlg*), exprimés en nombre de copies/ng d'ARNm total, peuvent varier considérablement entre laboratoires selon les procédures ou l'instrumentation utilisées, le niveau de *vlg* 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 inexplicées, 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 répliqués 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 fertiles 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.

## Appendice 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.

<b>Jours (après éclosion)</b>	<b>Artémies (mg poids sec/poisson/jour)</b>
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
Semaine 8-sacrifice	22,5

## Appendice 6

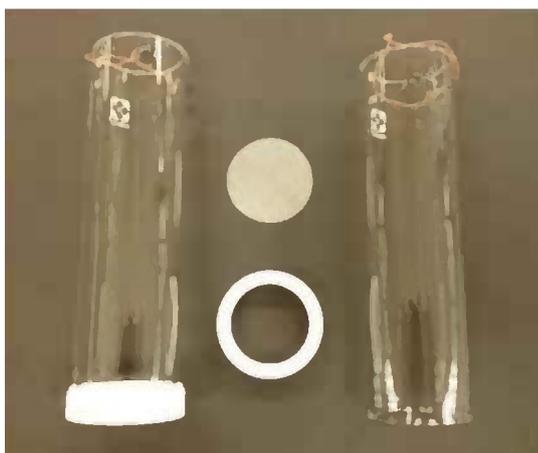
### **EXEMPLES DE CHAMBRES D'INCUBATION DES ŒUFS**

#### 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



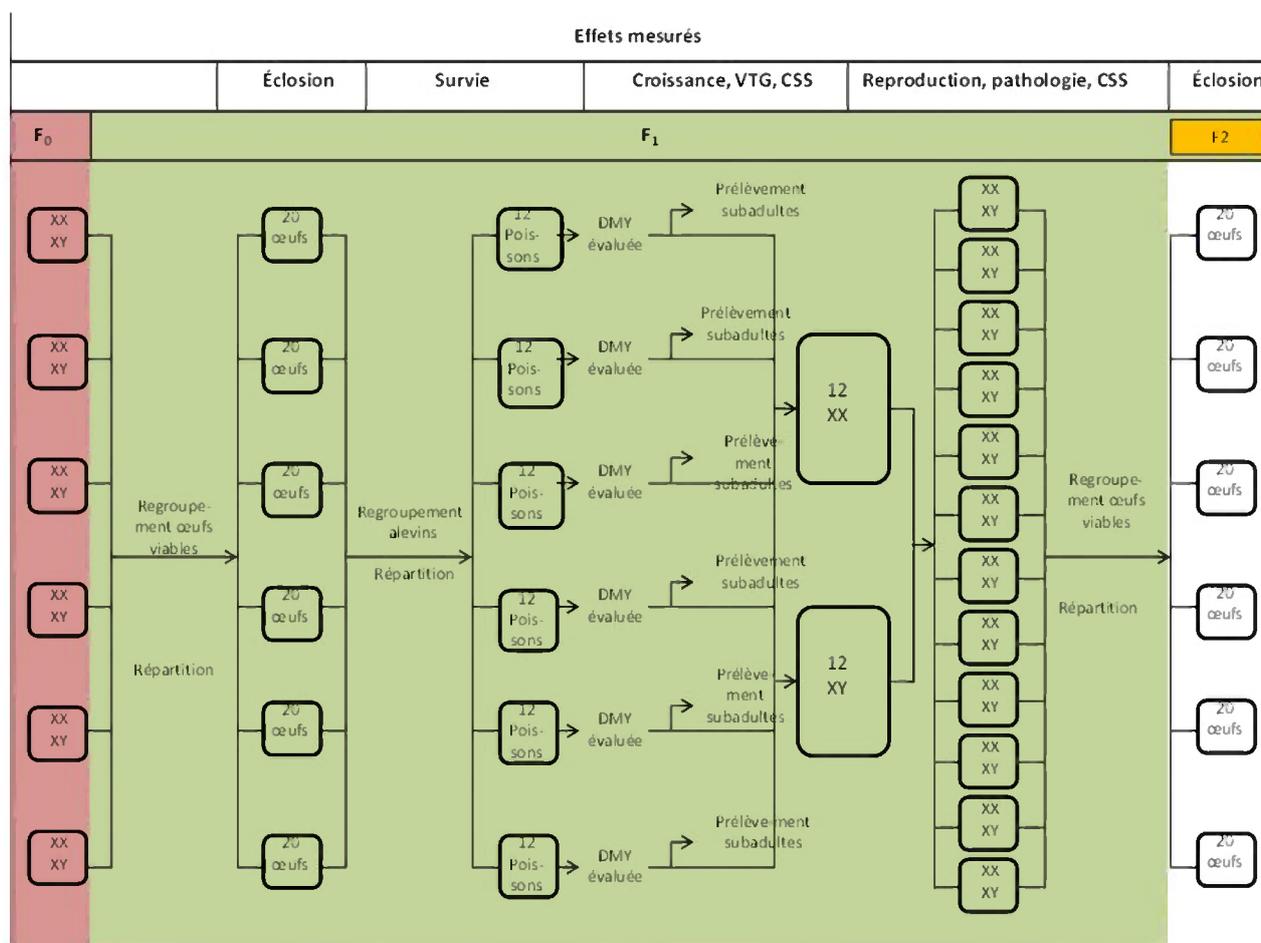


Cet incubateur est constitué d'un corps cylindrique en verre (5 cm de diamètre et 10 cm de hauteur) et d'une grille métallique inoxydable (0.25  $\phi$  et 32 mesh) maintenue au fond du corps cylindrique par un anneau en PTFE. Les incubateurs sont suspendus par une barre à mouvement vertical au-dessus 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).

## Appendice 7

### SCHEMA DU REGROUPEMENT ET DE LA REPARTITION DES REPLICATS DU DEBUT A LA FIN DE LA METHODE D'ESSAI MEOGRT

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



#### Traitements et réplification.

Cette méthode d'essai recommande cinq traitements par le produit chimique d'essai (produit de qualité technique) et un témoin négatif. Le nombre de répliquats par traitement n'est pas constant du début à la fin de l'essai MEOGRT, et le nombre de répliquats dans le groupe témoin est deux fois plus élevé que dans chacun des groupes traités. A la génération F<sub>0</sub>, chaque groupe traité par produit chimique d'essai comprend six répliquats alors que le groupe témoin négatif compte 12 répliquats. 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 de l'essai 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 d'essai et 24 couples réplicats dans le groupe témoin (ainsi que 24 couples réplicats dans le groupe témoin solvant, le cas échéant). 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 d'essai et 12 réplicats dans le(s) groupe(s) témoin.

## Appendice 8

### COMPTAGE DES PAPILLES DE LA NAGEOIRE ANALE

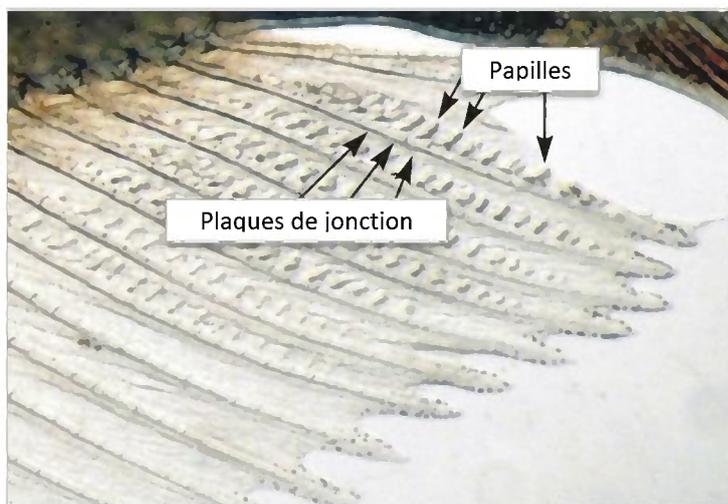
#### Principaux matériels et réactifs

- 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.



## Appendice 9

### **CHRONOLOGIE DÉTAILLÉE DE L'ESSAI 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 d'essai. 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.

#### **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 réplikat.

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 réplicat.

### **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 réplicat est consigné, ainsi que le nombre initial d'alevins placés dans le réplicat (valeur nominale: douze). Cela permet de calculer le taux de survie depuis l'éclosion jusqu'au stade subadulte.

### **Semaines d'essai 12-13 (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 réplicat 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 réplicat. Si un réplicat 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 réplicat) 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. 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 réplicat

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 réplicat. Les œufs récoltés sont évalués et les œufs fertiles (débarassés 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 réplicat 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 réplicats, 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 réplicats 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).

## Appendice 10

### **ANALYSE STATISTIQUE**

Les types de données biologiques générées lors de l'essai 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 de l'essai 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 de l'essai 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). 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**

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.

### **Comptage quotidien des œufs sur une seule génération**

Le modèle ANOVA est donné par  $Y = \text{temps} * \text{temps} + \text{traitement} + * \text{traitement} + \text{temps} * \text{traitement} + * \text{temps} * \text{traitement}$ , avec les effets aléatoires de réplicat (génération \* traitement) et temps \* réplicat (traitement), autorisant des composantes de variances inégales des deux types sur plusieurs générations. Le terme «temps» fait référence à la fréquence de comptage des œufs (jour ou semaine, par exemple). Il s'agit d'une analyse sur mesures répétées: les corrélations entre observations sur les mêmes réplicats rendent compte de la nature des données en tant que mesures répétées.

Les principaux effets des traitements sont soumis au test de Dunnett (ou Dunnett-Hsu), qui permet d'ajuster le nombre de comparaisons. Ces ajustements sont nécessaires pour la génération et le temps, car aucun de ces deux facteurs n'est associé à niveau «témoin» et chaque paire de niveaux est potentiellement intéressante à comparer. Dans les deux cas, si le test F pour le principal effet est significatif au niveau 0,05, les comparaisons par paires inter-niveaux de ce facteur peuvent être testées au niveau 0,05 sans ajustement supplémentaire.

Le modèle inclut des interactions à deux ou trois facteurs, si bien qu'un effet principal pour le temps, par exemple, peut ne pas être significatif, même si le temps a un impact significatif sur les résultats. Si une interaction à deux ou trois facteurs faisant intervenir le temps est significative au niveau 0,05, on peut donc accepter les comparaisons de niveaux de temps au niveau de significativité 0,05 sans ajustement supplémentaire.

Viennent ensuite les tests F pour la significativité du traitement dans le temps, c'est-à-dire les «tranches» (*slices*) du tableau ANOVA. Si, par exemple, la tranche correspondant au traitement appliqué à la génération F1 et au temps 12 est significative au niveau 0,05, les comparaisons par paires des traitements appliqués à la génération F1 et au temps 12 peuvent être acceptées au niveau 0,05 sans ajustement supplémentaire. Des règles similaires s'appliquent aux tests relatifs au temps dans la génération F1 au sein d'un traitement, ou à la génération associée à un temps et à un traitement donnés.

Enfin, pour les comparaisons ne relevant d'aucune des catégories ci-dessus, les comparaisons doivent être ajustées suivant la méthode d'ajustement des valeurs p de Bonferroni-Holm. On trouvera plus de précisions sur les analyses de ce type chez Hocking (1985) et Hochberg et Tamhane (1987).

Une autre méthode consiste à relever les données brutes et à les présenter dans le rapport comme la fécondité (nombre d'œufs) par réplicat pour chaque jour. La moyenne des données brutes par réplicat est calculée et une transformation racine carrée est appliquée. Une ANOVA à un critère est appliquée aux moyennes transformées par réplicat, suivie des contrastes de Dunnett. 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.

### **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 donc établie formellement 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 dans 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.

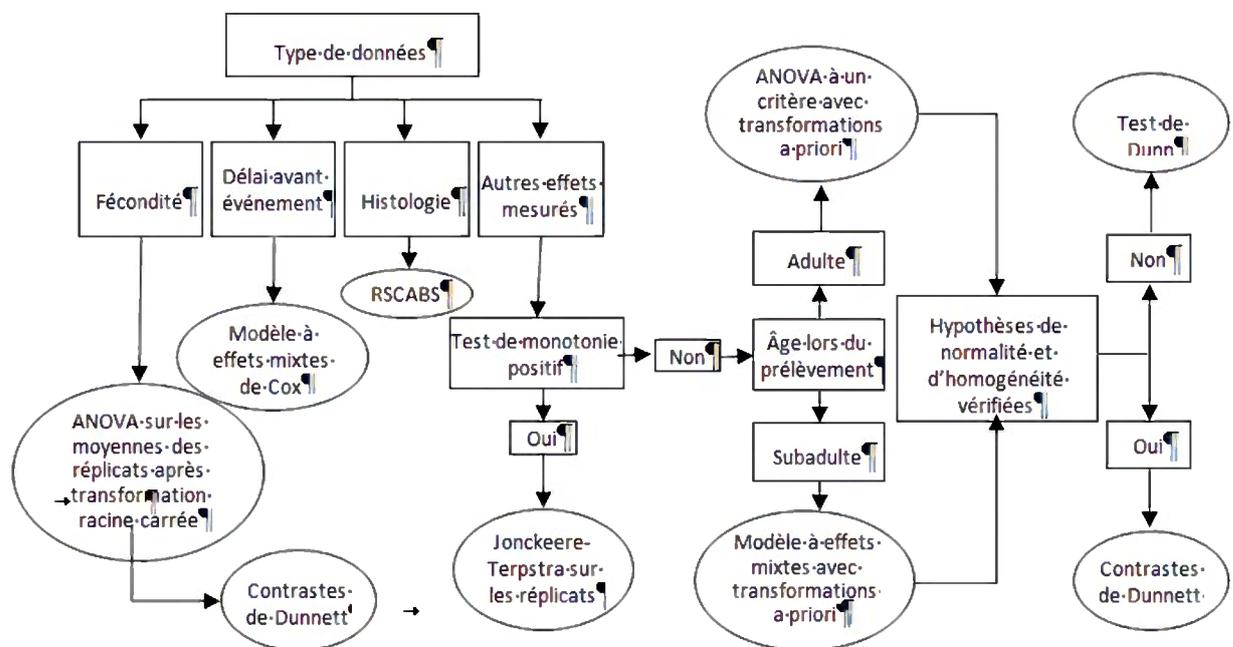
Pour le poids et la longueur, il n'est pas recommandé de transformer les données, bien que cela puisse occasionnellement être nécessaire. En revanche, une transformation logarithmique est recommandée pour les données relatives à la vitellogénine ; une transformation racine carrée est recommandée pour 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

différent 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).

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.

**Figure 2:** Logigramme des procédures statistiques recommandées pour l'analyse des données de l'essai MEOGRT.



## Bibliographie

- (1) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (Les annexes de cette publication constituent un document à part), Publications de l'OCDE, , Paris.
- (2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

- (3) Hocking RR (1985). *The Analysis of Linear Models*, Monterey, CA: Brooks/Cole.
- (4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). *Multiple Comparison Procedures*. John Wiley and Sons, New York.

## C.53 ESSAI DE CROISSANCE ET DE DÉVELOPPEMENT DE LARVES D'AMPHIBIENS (LAGDA)

### INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice (LD) 241 (2015) de l'OCDE. Le développement et la validation d'un essai capable de détecter et de caractériser les conséquences néfastes de l'exposition à des produits chimiques toxiques chez les amphibiens sont devenus nécessaires du fait des inquiétudes relatives à la présence dans l'environnement de produits chimiques dans des teneurs susceptibles de provoquer des effets néfastes sur les humains et la faune. La ligne directrice de l'OCDE pour l'essai de croissance et de développement de larves d'amphibiens (LAGDA) décrit un essai de toxicité mené sur une espèce d'amphibiens; cet essai (d'une durée de 16 semaines, en général) consiste à étudier la croissance et le développement des amphibiens depuis la fécondation jusqu'à la période juvénile précoce. Il permet d'évaluer le développement initial, la métamorphose, la survie, la croissance et la maturation partielle du système reproducteur. Il permet également de mesurer une série d'autres effets observés en vue d'une évaluation diagnostique des produits chimiques suspectés d'être des perturbateurs endocriniens, ou d'autres types de substances ayant des effets toxiques sur le développement et la reproduction. La méthode décrite ici est inspirée des travaux de validation menés sur le xénope lisse (*Xenopus laevis*) par l'Agence pour la protection de l'environnement des États-Unis (U.S. EPA) avec l'aide du Japon (1). D'autres espèces d'amphibiens peuvent convenir à un protocole d'essai sur la croissance et le développement à même de déterminer si le sexe génétique est un élément important, mais les méthodes et effets observés spécifiques décrits dans la présente méthode d'essai s'appliquent exclusivement à *Xenopus laevis*.
2. Le LAGDA est utilisé comme essai de niveau supérieur sur amphibien pour recueillir des informations plus complètes sur les relations concentration-réponse induisant des effets néfastes, informations qui servent ensuite pour l'identification et la caractérisation des dangers ainsi que pour l'évaluation du risque écologique. Le présent essai se positionne au niveau 4 du Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens, sachant que les essais *in vivo* fournissent également des données sur les effets néfastes basées sur les effets mesurés pertinents du système endocrinien (2). Le plan expérimental général comprend l'exposition d'embryons de *X. laevis* au stade de développement 8-10 d'après Nieuwkoop et Faber (NF) (3) à un minimum de quatre concentrations différentes du produit chimique d'essai (généralement espacées par des intervalles définis selon une progression semi-logarithmique) et un/des témoin(s) jusqu'à 10 semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le témoin, avec un sous-échantillon provisoire au stade NF62 ( $\leq 45$  jours post-fécondation; habituellement autour

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

### REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

3. Étant donné le nombre limité de produits chimiques testés et le nombre limité de laboratoires impliqués dans l'étude de validation de cette méthode d'essai complexe, on peut s'attendre à ce que la ligne directrice 241 de l'OCDE soit réexaminée et si nécessaire mise à jour à la lumière de l'expérience acquise, et quand un nombre suffisant d'études sera disponible pour s'assurer de l'impact de cette méthode d'essai. Le LAGDA est un essai important qui permet d'étudier les facteurs pouvant contribuer à un déclin de la population d'amphibiens en évaluant les effets de l'exposition à des produits chimiques durant le stade larvaire, où les effets sur la survie et le développement, y compris le développement normal des organes reproducteurs, peuvent avoir des répercussions dommageables sur les populations.
4. Le test est conçu pour détecter des effets apicaux résultant de mécanismes endocriniens et non endocriniens, et comprend des paramètres diagnostiques mesurés qui sont, en partie, spécifiques aux principaux mécanismes endocriniens. Il convient de noter que, jusqu'à ce que le LAGDA soit développé, il n'existait aucun essai validé remplissant cette fonction pour les amphibiens.
5. Avant de commencer l'essai, il est important de disposer d'informations sur les propriétés physico-chimiques du produit chimique d'essai, notamment pour pouvoir produire des solutions chimiques stables. Il est également nécessaire de disposer d'une méthode d'analyse suffisamment sensible pour pouvoir vérifier les concentrations du produit chimique d'essai. L'essai dure 16 semaines environ et nécessite au total 480 animaux, à savoir des embryons de *X. laevis*, (ou 640 embryons en cas d'utilisation d'un témoin avec solvant) afin que

l'essai soit suffisamment puissant pour évaluer les effets observés au niveau de la population (croissance, développement et maturation du système reproducteur, par exemple).

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

## FONDEMENT SCIENTIFIQUE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

7. Une grande partie des connaissances dont nous disposons sur la biologie des amphibiens ont été obtenues à l'aide de l'espèce de laboratoire modèle *X. laevis*. Cette espèce peut être cultivée en routine au laboratoire, l'ovulation peut être induite par l'emploi de gonadotrophine chorionique humaine (hCG), et il est possible de se procurer facilement des animaux auprès des fournisseurs commerciaux.
8. Comme chez tous les vertébrés, la reproduction des amphibiens est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG) (4). Les œstrogènes et les androgènes sont des médiateurs de ce système endocrinien; ils contrôlent le développement et la physiologie des tissus sexuellement dimorphiques. Le cycle de vie des amphibiens se décompose en trois phases successives durant lesquelles cet axe est particulièrement actif: (1) la différenciation gonadique pendant le développement larvaire, (2) le développement des caractères sexuels secondaires et la maturation des gonades pendant la phase juvénile et (3) la reproduction fonctionnelle des adultes. À chacune de ces trois phases de développement, le système endocrinien est susceptible d'être perturbé par certains produits chimiques (œstrogènes et androgènes, par exemple), ce qui finira par entraîner une diminution de la capacité de reproduction des organismes.
9. Les gonades commencent à se développer au stade NF 43 d'après Nieuwkoop et Faber, au moment de la formation de la crête génitale bipotentielle. La différenciation des gonades commence au stade NF 52 lorsque les cellules germinales primordiales migrent vers le tissu médullaire (mâles) ou bien restent dans la région corticale (femelles) des gonades en développement (3). Ce processus de différenciation sexuelle des gonades a été signalé pour la première fois comme sensible à l'action des produits chimiques chez *Xenopus laevis* dans les années 1950 (5) (6). L'exposition de têtards à l'œstradiol durant cette période de différenciation gonadique provoque un changement de sexe chez les mâles, qui deviennent des femelles pleinement fonctionnelles une fois parvenus à l'âge adulte (7) (8). L'inversion fonctionnelle du sexe des femelles en mâles est également possible et a été rapportée après l'implantation de tissu testiculaire sur des têtards (9). Cependant, si l'exposition à un inhibiteur de l'aromatase entraîne également un changement de sexe fonctionnel chez *X.*

*tropicalis* (10), cet effet n'a pas été constaté chez *X. laevis*. Historiquement, les effets de produits toxiques sur la différenciation gonadique étaient évalués par l'examen histologique des gonades au moment de la métamorphose, et le changement de sexe ne pouvait être déterminé que par l'analyse des sex-ratios génotypiques/phénotypiques. Jusqu'à une date récente, il n'existait aucun moyen de déterminer directement le sexe génétique de *Xenopus*. Cependant, la création récente de marqueurs sexuels chez *X. laevis* permet de déterminer le sexe génétique et d'identifier directement les animaux dont le sexe a changé (11).

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

## PRINCIPE DE L'ESSAI

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

## CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

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

- La concentration d'oxygène dissous est  $\geq 40$  % de la valeur de saturation en air tout au long de l'essai;
  - La température de l'eau est de  $21 \pm 1$  °C et les différentiels inter-répliat et inter-traitement n'excèdent pas  $1,0$  °C;
  - Le pH de la solution d'essai demeure entre 6,5 et 8,5, et les différentiels inter-répliat et inter-traitement n'excèdent pas 0,5;
  - Les données disponibles démontrent que la concentration du produit chimique d'essai en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de  $\pm 20$  % autour des valeurs moyennes mesurées;
  - La mortalité au cours de la période d'exposition est  $\leq 20$  % dans chaque répliat en ce qui concerne les témoins;
  - La viabilité est  $\geq 70$  % dans le frai choisi pour commencer l'étude;
  - Le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le témoin est  $\leq 45$  jours;
  - Le poids moyen des organismes d'essai au stade NF62 et à la fin de l'essai dans les témoins et les témoins avec solvant (si un solvant est utilisé) atteint  $1,0 \pm 0,2$  et  $11,5 \pm 3$  g, respectivement.
13. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un critère de validité, il est recommandé de disposer pour l'analyse d'au moins trois niveaux de traitement avec trois répliat non compromis. Une mortalité excessive, ce qui compromet un traitement, est définie comme plus de 4 décès ( $> 20$  %) ne pouvant pas s'expliquer par une erreur technique dans au moins deux répliat. Au moins trois niveaux de traitement exempts de toxicité manifeste sont nécessaires pour effectuer les analyses. Les signes de toxicité manifeste peuvent comprendre, sans s'y limiter, des animaux flottant à la surface, immobiles au fond du vivier, une nage inversée ou irrégulière, un manque d'activité à la surface et l'absence de réponse au stimulus, des anomalies morphologiques (difformité des membres, par exemple), des lésions hémorragiques et des œdèmes abdominaux.
14. Si un écart par rapport aux critères de validité de l'essai est observé, les conséquences doivent être appréciées au regard de la fiabilité des résultats de l'essai et ces écarts et leur appréciation doivent être consignés dans le rapport d'essai.

## **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**

### **Appareillage**

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

- (a) appareil de contrôle de la température (dispositifs de chauffage et de refroidissement réglables à  $21 \pm 1$  °C, par exemple);

- (b) thermomètre;
- (c) microscope binoculaire à dissection et instruments de dissection;
- (d) caméra numérique dotée d'une résolution minimale de 4 mégapixels et d'une fonction micro (si nécessaire);
- (e) balance analytique d'une précision de 0,001 mg ou 1 µg;
- (f) appareil de mesure de l'oxygène dissous et pH-mètre;
- (g) appareil de mesure de l'intensité lumineuse capable de fournir des résultats en lux.

## Eau

### *Source et qualité*

16. Toute eau de dilution disponible localement ( eau de source ou eau du robinet filtrée sur charbon, par exemple) et permettant la croissance et le développement normaux de *X. laevis* peut être employée, et des informations concrètes attestant de cette capacité doivent être disponibles. Dans la mesure où la qualité de l'eau est susceptible de varier de façon importante d'une zone à l'autre, elle est évaluée, en particulier en l'absence de données historiques concernant l'usage de cette eau pour élever des larves d'amphibiens. Le dosage des métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), des principaux anions et cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , par exemple), des pesticides, du carbone organique total et des solides en suspension doit être effectué avant le lancement de l'essai et/ou tous les six mois, par exemple, pour une eau de dilution connue pour être de qualité relativement constante. Certaines caractéristiques chimiques pour une eau de dilution acceptable sont énumérées à l'appendice 2.

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

17. Pour que la glande thyroïde puisse synthétiser les hormones qui favoriseront une métamorphose normale, les larves doivent disposer de quantités suffisantes d'iode, provenant d'une combinaison de sources aqueuses et alimentaires. Il n'existe aujourd'hui aucune recommandation d'origine empirique concernant les concentrations d'iode minimales dans la nourriture ou l'eau nécessaires pour assurer un bon développement. Cependant, la disponibilité de l'iode est susceptible d'affecter la capacité de réponse du système thyroïdien aux agents actifs sur la thyroïde, un facteur par ailleurs connu pour influencer l'activité basale de cette glande: ce point mérite d'être pris en compte lors de l'interprétation des résultats d'histopathologie de la thyroïde. D'après des travaux précédents, la réussite de l'essai a été démontrée lorsque les concentrations d'iode dans l'eau de dilution (I<sup>-</sup>) sont comprises entre 0,5 et 10 µg/l. Idéalement, la concentration minimale d'iode dans l'eau de dilution au cours de l'essai doit être de 0,5 µg/l (ajouté sous forme de sodium ou de sel de potassium). Lorsque l'essai est mené avec de l'eau désionisée, un supplément d'iode est nécessaire afin d'atteindre cette concentration minimale de 0,5 µg/l. Les concentrations mesurées d'iode dans l'eau de l'essai (eau de

dilution) et l'ajout d'iode ou d'autres sels (en cas d'utilisation) à l'eau de l'essai sont notifiés dans le rapport. La teneur en iode peut aussi être mesurée dans la nourriture, en plus de l'eau de l'essai.

### **Système d'exposition**

18. L'essai a été développé en utilisant un système de dilution dynamique est employé pour cet essai. Les composants du système sont constitués d'un matériau adapté au contact avec l'eau, comme le verre, l'acier inoxydable ou d'autres matériaux chimiquement inertes. Les viviers d'exposition sont constitués d'aquariums de verre ou d'acier inoxydable, le volume utilisable étant compris entre 4,0 et 10,0 l (profondeur minimum de l'eau de 10 à 15 cm). Le système doit être capable de prendre en charge l'ensemble des concentrations d'exposition, un témoin seul et un témoin avec solvant, si nécessaire, chaque concentration d'essai étant testée sur quatre réplicats, avec huit réplicats pour les témoins. La vitesse d'écoulement de chaque récipient est constante afin de garantir la stabilité des conditions biologiques et de l'exposition chimique. Il est recommandé de maintenir dans les viviers un débit approprié (minimum cinq renouvellements par jour, par exemple) afin d'éviter une baisse de la concentration de produit chimique du fait du métabolisme des organismes d'essai et des microorganismes aquatiques présents dans les aquariums, des voies de dégradation abiotiques (hydrolyse, photolyse) ou de la dissipation (volatilisation, sorption). Les viviers sont disposés de manière aléatoire au sein du système d'exposition, de manière à amoindrir les effets éventuellement liés à la position, notamment de légères variations de température, d'intensité lumineuse, etc. On trouvera des informations complémentaires concernant la mise en place de systèmes d'exposition dynamiques dans le guide de l'ASTM intitulé *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (16).

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

19. Pour préparer les solutions d'essai dans le système d'exposition, il convient d'introduire dans le système une solution-mère du produit chimique d'essai à l'aide d'une pompe appropriée ou d'un autre appareil. Le débit de la solution-mère doit être calibré d'après les données analytiques relatives aux solutions d'essai établies avant le début de l'exposition, et faire l'objet d'un contrôle volumétrique périodique au cours de l'essai. La solution d'essai de chaque vivier doit être renouvelée à raison de cinq renouvellements en volume/jour au minimum.
20. La méthode employée pour introduire le produit chimique d'essai dans le système varie en fonction des propriétés physico-chimiques du produit concerné. Par conséquent, avant la mise en œuvre de ce protocole, il convient de collecter les informations de référence sur le produit chimique en question pour déterminer sa testabilité. En ce qui concerne les propriétés du produit chimique d'essai, les informations suivantes sont utiles: formule structurale, poids moléculaire, pureté, stabilité dans l'eau et à la lumière, pKa et Ko/e,

hydrosolubilité (de préférence dans le milieu d'essai) et pression de vapeur, ainsi que résultats d'un essai de biodégradabilité facile [méthode d'essai C.4 (17) ou C.29 (18)]. On peut utiliser la solubilité et la pression de vapeur pour calculer la constante de Henry, qui indique les risques de perte par évaporation du produit chimique d'essai. La conduite de cet essai sans les informations énumérées ci-dessus doit être envisagée avec prudence sachant que la conception de l'essai sera fonction des propriétés physico-chimiques du produit chimique d'essai et que, sans ces données, les résultats de l'essai peuvent se révéler difficiles à interpréter voire dénués de sens. Pour déterminer la concentration du produit chimique d'essai dans les solutions d'essai, il convient d'appliquer une méthode d'analyse fiable, dont la précision et la limite de détection sont connues et mentionnées dans le rapport. Les composés hydrosolubles peuvent être mis en solution en aliquotes dans l'eau utilisée pour l'essai à des concentrations aboutissant à la teneur voulue dans le cadre d'une introduction au moyen d'un système dynamique. Les produits chimiques qui sont liquides ou solides à température ambiante et modérément hydrosolubles peuvent nécessiter des saturateurs liquide: liquide ou liquide:solide (colonne de laine de verre, par exemple) (19). Même s'il est également possible d'administrer des substances d'essai très hydrophobes par le biais de l'alimentation, cette voie d'exposition n'a guère été explorée jusqu'à présent dans cet essai.

21. Les solutions testées de concentrations choisies sont préparées par dilution d'une solution mère. La solution mère est préparée de préférence en mélangeant simplement ou en agitant le produit chimique d'essai dans de l'eau de dilution par des moyens mécaniques (e.g. par agitation ou par ultrasons). Des colonnes ou des systèmes de saturation ou des méthodes de dosage passif (20) peuvent être utilisées pour obtenir une solution mère suffisamment concentrée. Les systèmes dépourvus de véhicules sont préférables; cependant les différents produits chimiques testés possèdent des propriétés physico-chimiques variables, qui réclament des approches diverses pour la préparation des solutions aqueuses servant à l'exposition chimique. On s'efforcera dans toute la mesure du possible d'éviter l'emploi de solvants et autres véhicules car: (1) certains solvants peuvent avoir eux-mêmes des effets toxiques et/ou induire des réponses indésirables ou inattendues, (2) l'essai de produits chimiques à une concentration supérieure à leur solubilité dans l'eau (ce qui arrive fréquemment si des solvants sont utilisés) peut fausser la détermination des concentrations efficaces, (3) le recours aux solvants dans les essais à long terme peut se traduire par la formation importante de biofilms associés à une activité microbienne, ce qui peut influencer sur les conditions environnementales et sur la capacité de maintenir les concentrations d'exposition, (4) en l'absence de données historiques démontrant que le solvant n'influe pas sur les résultats de l'étude, l'usage de solvants nécessite le traitement d'un groupe témoin avec solvant, ce qui a des effets significatifs en termes de bien-être animal, des animaux supplémentaires étant alors nécessaires pour la conduite de l'essai. Pour les produits chimiques difficiles à tester, un solvant peut être employé en dernier ressort, et l'on consultera alors le document d'orientation de l'OCDE sur les essais de toxicité

aquatique des substances et mélanges «difficiles» (21) afin de déterminer la meilleure méthode à employer. Le solvant sera choisi en fonction des propriétés chimiques du produit chimique d'essai et de la disponibilité de données des témoins historiques sur le solvant. En l'absence de données historiques, il est nécessaire de déterminer la pertinence du solvant avant de procéder à l'étude définitive. Si le recours à un solvant est inévitable et si une activité microbienne (formation de biofilms) se produit, il est recommandé de noter/consigner dans le rapport la présence de biofilms dans chaque vivier (au moins une fois par semaine) pendant toute la durée de l'essai. Idéalement, la concentration de solvant devra être maintenue constante dans le témoin avec solvant et tous les groupes traités. Si la concentration de solvant n'est pas maintenue constante, c'est la plus forte concentration de solvant dans le traitement d'essai qui sera utilisée dans le témoin avec solvant. Si un solvant est utilisé comme véhicule, les concentrations maximales de solvant ne devront pas dépasser 100 µl/l ou 100 mg/l (21), et il est recommandé de maintenir la concentration de solvant aussi bas que possible ( $\leq 20$  µl/l, par exemple) pour éviter que le solvant puisse avoir une incidence sur les effets mesurés (22).

## **Animaux d'essai**

### *Espèces d'essai*

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

### Soin et reproduction des adultes

23. Les méthodes de soin et de reproduction adaptées à *X. laevis* sont décrites dans un guide de l'ASTM (23). Les conditions d'encagement de *X. laevis* et les méthodes de soin adaptées à cette espèce sont également décrites par Read (24). Pour provoquer la reproduction, entre trois et cinq paires d'adultes mâles et femelles reçoivent une injection intrapéritonéale de gonadotropine chorionique humaine (hCG). La dose injectée aux femelles et aux mâles s'élève respectivement à environ 800 UI – 1 000 UI et 500 UI – 800 UI de hCG dissous dans une solution saline à 0,6 – 0,9 % (ou une solution de Ringer isotonique saline applicable aux amphibiens; [www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html](http://www.hermes.mbl.edu/biologicalbulletin/compendium/comp-RGR.html)). Les volumes injectés sont équivalents à environ 10 µl/g de poids corporel (~1 000 µl). Ensuite, les couples de reproducteurs sont placés dans de grands viviers, à l'abri des perturbations et dans des conditions statiques, en vue de stimuler l'amplexus. Chaque vivier de reproduction est équipé d'une grille en acier inoxydable en guise de faux plancher (ouvertures de 1.25 cm, par exemple), permettant aux amas d'œufs de tomber dans un double fond. Si les grenouilles reçoivent une injection de hCG en fin d'après-midi, elles déposent habituellement la majorité de leurs œufs vers le milieu de la matinée suivante. Lorsqu'une quantité suffisante d'œufs ont été libérés et fécondés, il convient de retirer les adultes des viviers de reproduction. Les œufs sont alors collectés, et la gangue

gélatineuse est éliminée par traitement à la L-cystéine (23). Une solution de L-cystéine à 2 % est préparée, et le pH est ajusté à 8.1 avec du NaOH 1 M. Cette solution à 21 °C est versée dans un flacon Erlenmeyer de 500 ml contenant les œufs d'un seul frai, brassée délicatement pendant une à deux minutes, puis rincée soigneusement 6 à 8 fois avec de l'eau de culture à 21 °C. Les œufs sont ensuite transférés dans un cristalliseur, et leur viabilité est déterminée: elle doit être > 70 % et les embryons en phase de division cellulaire doivent présenter des anomalies minimales.

## **CONCEPTION DE L'ESSAI**

### **Concentrations d'essai**

24. Il est recommandé d'utiliser un minimum de quatre concentrations du produit chimique d'essai et des témoins appropriés (comprenant, si nécessaire, des témoins avec solvant). En règle générale, il est recommandé d'espacer les concentrations d'un facteur ne dépassant pas 3.2.
25. Pour les besoins de cet essai, on s'appuiera autant que possible sur les résultats d'études existantes sur les amphibiens pour déterminer la concentration d'essai la plus élevée, de manière à éviter des concentrations manifestement toxiques. Les informations fournies, par exemple, par les relations quantitatives structure-activité, les références croisées et les données d'études existantes sur les amphibiens telles que l'essai de métamorphose des amphibiens, la méthode d'essai C.38 (25) et le guide de l'ASTM *Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus* (23) et/ou les résultats d'essais sur les poissons [méthodes d'essai C.48, C.41 et C.49] (26) (27) (28) peuvent contribuer à la définition de cette concentration. Avant le lancement du LAGDA, une expérience préliminaire de détermination des gammes de concentration pourra être menée. Il est recommandé de commencer cette expérience dans les 24 heures qui suivent la fécondation et de maintenir l'exposition pendant 7-14 jours (ou plus, si nécessaire), ainsi que de fixer les concentrations d'essai de telle sorte qu'elles soient espacées par un facteur de 10. La gamme de concentrations ainsi obtenue servira à fixer la concentration d'essai maximale dans le LAGDA. On notera que si un solvant doit être utilisé, la pertinence de celui-ci (la question étant de savoir si ce solvant peut influencer sur le résultat de l'étude) pourra être déterminée dans le cadre de la détermination de la gamme de concentrations.

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

26. Un minimum de quatre réplicats par concentration d'essai et un minimum de huit réplicats pour les témoins (et le témoin avec solvant, si nécessaire) sont utilisés (ce qui signifie que le nombre de réplicats dans le témoin et l'éventuel témoin avec solvant doit être deux fois supérieur au nombre de réplicats dans chaque groupe traité, pour que l'essai ait une puissance statistique appropriée). Chaque réplicat doit contenir au maximum 20 animaux. Au minimum 15 animaux sont traités (cinq pour le sous-échantillon au stade NF62 et 10

juvéniles). Toutefois, des animaux supplémentaires seront ajoutés dans chaque réplicat pour maintenir le nombre critique de 15 en cas de décès.

## **PROCÉDURE**

### **Synthèse de l'essai**

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

### **Conditions d'exposition**

28. Un résumé complet des paramètres d'essai est présenté à l'appendice 3. Au cours de la période d'exposition, l'oxygène dissous, la température et le pH des solutions d'essai sont mesurés quotidiennement. La conductivité, l'alcalinité et la dureté sont mesurées une fois par mois. En ce qui concerne la température de l'eau des solutions d'essai, les différentiels inter-réplicat et inter-traitement (sur une journée) ne doivent pas dépasser 1,0 °C. De même, en ce qui concerne le pH des solutions d'essai, les différentiels inter-réplicat et inter-traitement ne doivent pas dépasser 0,5.

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

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

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

### **Lancement de l'essai**

31. On aura démontré précédemment que les parents utilisés pour le lancement de l'essai peuvent avoir une descendance génétiquement sexuée (appendice 5). Après le frai des adultes, les embryons sont collectés, traités à la cystéine pour éliminer la gangue gélatineuse et sélectionnés en fonction de leur viabilité (23). Le traitement à la cystéine permet de manipuler les embryons sans que ces derniers collent aux surfaces. La sélection se fait sous un microscope à dissection, en utilisant un compte-gouttes de taille appropriée pour éliminer les embryons non viables. Il est préférable d'utiliser pour l'essai un seul frai donnant une viabilité supérieure à 70 %. Les embryons au stade NF 8-10 sont répartis de façon aléatoire dans les cuves de traitement contenant un volume approprié d'eau de dilution jusqu'à ce que chaque cuve contienne 20 embryons. Il convient de manipuler les embryons avec précaution durant le transfert afin de minimiser leur stress et d'éviter de les blesser. Quatre-vingt-seize (96) heures après la fécondation, les têtards doivent être remontés le long de la colonne d'eau et avoir commencé à s'accrocher aux parois de la cuve.

### **Régime alimentaire**

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

#### *Alimentation des larves*

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

d'analyse: (1) le délai médian jusqu'au stade NF62 dans les témoins doit être  $\leq 45$  jours et (2) un poids moyen de  $1,0 \pm 0,2$  g au stade NF62 dans les témoins est recommandé.

#### *Alimentation des juvéniles*

34. Une fois la métamorphose achevée, le régime alimentaire se compose de nourriture de premier choix pour amphibiens de type 3/32 pouces (Xenopus Express, FL, États-Unis) (appendice 4). Pour les jeunes grenouilles (juvéniles précoces), broyer brièvement les granulés dans un moulin à café ou un mixeur ou bien écrasés dans un mortier avec un pilon afin de réduire leur taille. Une fois que les juvéniles sont assez grands pour consommer des granulés entiers, le broyage / l'écrasement ne sont plus nécessaires. Les animaux sont nourris une fois par jour. L'alimentation des juvéniles doit permettre la croissance et le développement appropriés des organismes: un poids moyen de  $11,5 \pm 3$  g dans les témoins à la fin de l'essai est recommandé.

#### **Analyse chimique**

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

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

solution d'essai dans chaque cuve afin que les concentrations d'essai restent aussi constantes que possible.

### Observations et effets mesurés

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

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

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

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

### Mortalité et observations quotidiennes

38. L'ensemble des viviers est vérifié quotidiennement pour détecter les animaux morts, et les décès survenus dans chaque vivier sont notés dans le rapport. Les animaux morts sont retirés du vivier d'essai dès qu'ils sont identifiés. Leur stade de développement doit être classé comme soit antérieur au stade NF 58 (avant l'apparition des membres antérieurs), soit entre les stades NF 58 et NF 62, soient entre les stades NF 63 et NF 66 (entre le stade NF62 et l'absorption totale de la queue) soit postérieur au stade NF 66 (post-larvaire). Les

taux de mortalité supérieurs à 20 % sont des indicateurs potentiels de conditions d'essai mal adaptées, ou d'effets toxiques manifestes du produit chimique d'essai. Les animaux ont tendance à être plus sensibles à des épisodes de mortalité non induite par des produits chimiques au cours des premiers jours de développement qui suivent le frai et pendant le paroxysme métamorphique. Cette mortalité peut apparaître dans les données issues des témoins.

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

### **Sous-échantillons de larves**

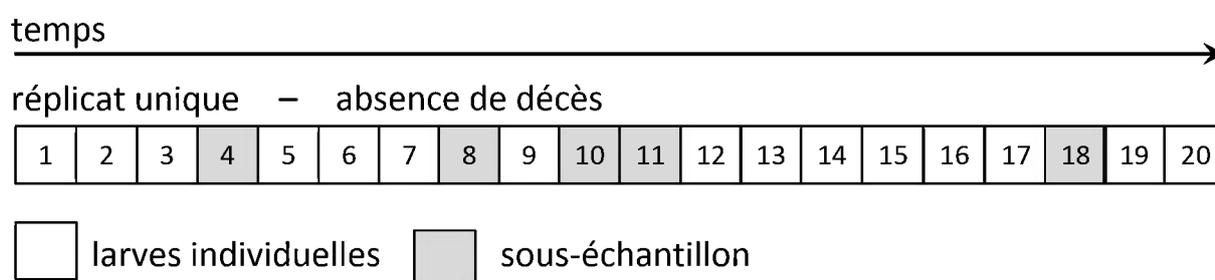
*Description générale de la préparation des sous-échantillons de larves:*

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

le tronc du têtard et que les membres antérieurs ont atteint le niveau du milieu du cœur, l'individu considéré est consigné comme ayant atteint le stade NF62.

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

**Figure 1:** Exemple hypothétique d'échantillonnage au stade NF62 dans un réplicat unique



42. Les effets observés sur les sous-échantillons de larves sont les suivants: (1) délai jusqu'au stade NF62 (à savoir, le nombre de jours écoulés entre la fécondation et le stade NF62), (2)

anomalies externes, (3) morphométrie (poids et longueur, par exemple) et (4) histologie de la thyroïde.

#### *Euthanasie des têtards*

43. Le sous-échantillon de têtards au stade NF62 (cinq individus par réplicat) est euthanasié par immersion pendant 30 minutes dans des quantités appropriées (500 ml, par exemple) de solution anesthésique (solution à 0,3 % de MS-222, méthanesulfonate de tricaine, CAS.886-86-2, par exemple). La solution de MS-222 doit être tamponnée au bicarbonate de sodium (pH 7,0 environ), car une solution de MS-222 non tamponnée est acide et irritante pour la peau des grenouilles, ce qui entraîne une mauvaise absorption et un stress supplémentaire inutile pour les organismes.
44. Le têtard est retiré de la cuve expérimentale avec une épuisette à filet puis transporté (déposé) dans la solution euthanasique. Après avoir été euthanasié correctement, l'animal est prêt pour la nécropsie lorsqu'il ne réagit plus à des stimuli extérieurs tels que le pincement de la patte arrière avec une paire de forceps.

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

45. Le poids humide (au mg près) et la longueur museau-cloaque (LMC) (à 0,1 mm près) de chaque têtard sont mesurés dès que le têtard ne répond plus aux stimuli sous l'effet de l'anesthésie (figure 2a). Il est possible d'utiliser un logiciel d'analyse d'images pour mesurer la LMC à partir d'une photographie. Les têtards sont séchés par tamponnage avant la pesée afin d'éliminer l'eau adhérente en excès. Après le mesurage du poids et de la LMC, les anomalies morphologiques manifestes et/ou signes cliniques de toxicité manifeste tels qu'une scoliose (voir l'appendice 8), les pétéchies (petites hémorragies rouges ou violacées au niveau des capillaires sous-cutanés) et les hémorragies sont consignées, et il est recommandé d'employer une méthode numérique d'identification des anomalies.

#### *Collecte et fixation des tissus*

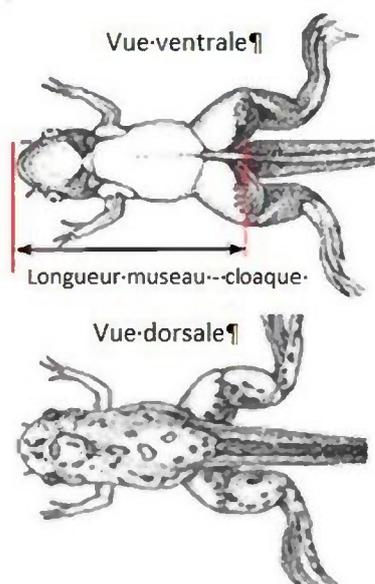
46. Les glandes thyroïdes du sous-échantillon de larves sont évaluées en vue de l'histologie. La partie inférieure du torse située à l'arrière des membres antérieurs est retirée et jetée. La carcasse découpée est fixée dans du fixateur de Davidson. Le volume de fixateur dans le conteneur doit être supérieur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

#### *Histologie de la thyroïde*

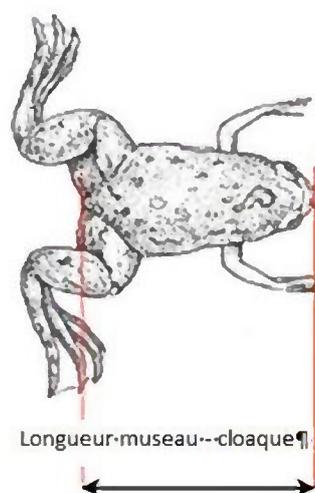
47. Chaque sous-échantillon de larves (tissus fixés) fait l'objet d'une évaluation histologique de la glande thyroïde permettant de poser un diagnostic et d'évaluer l'indice de gravité (29) (30).

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

a. Sous-échantillon de larves (stade NF-62) ¶



b. Échantillon de juvéniles ¶



### Fin de l'exposition larvaire

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

### Sélection après le stade NF66

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

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

## **Échantillons de juvéniles**

### *Description générale de la préparation des échantillons de juvéniles*

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

### *Euthanasie des grenouilles*

52. Les échantillons de juvéniles (grenouilles post-métamorphiques) sont euthanasiés par injection intrapéritonéale d'un anesthésique (MS-222 à 10 % dans une solution tamponnée de phosphate appropriée, par exemple). Les grenouilles peuvent être prélevées une fois devenues insensibles (habituellement deux minutes environ après l'injection, en cas d'utilisation de MS-222 à 10 % à raison de 0,01 ml par g de grenouille). Les jeunes grenouilles pourraient être immergées dans un anesthésique plus concentré (MS-222), mais l'expérience a montré qu'une anesthésie selon cette méthode prend plus de temps et que cette durée ne convient peut-être pas pour l'échantillonnage. L'injection permet d'euthanasier les animaux de manière rapide et efficace avant l'échantillonnage. Ce dernier ne doit pas démarrer avant confirmation que les grenouilles sont insensibles, le but étant de s'assurer que les animaux sont bien morts. Si les têtards montrent des signes de souffrance considérable (i.e. sévères et que leur mort est prévisible) et que leur état est moribond, les animaux doivent être anesthésiés puis euthanasiés, et traités comme des cas de mortalité lors de l'analyse des données. Quand un têtard est euthanasié dans ce cas sévère, il faut le consigner dans le rapport d'essai. En fonction du moment de l'essai ou le têtard est euthanasié, il peut être retenu pour une analyse histopathologique, en fixant le spécimen préalablement à une analyse future.

### *Morphométrie (poids et longueur)*

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

### *VTG plasmatique (optionnel)*

54. La VTG est un biomarqueur largement accepté résultant de l'exposition à des produits chimiques œstrogéniques. En ce qui concerne le LADGA, la VTG plasmatique peut éventuellement être mesurée dans des échantillons de juvéniles (ce qui peut être particulièrement utile si le produit chimique d'essai est présumé être un œstrogène).
55. Les membres postérieurs des juvéniles euthanasiés sont sectionnés et le sang est prélevé au moyen d'un tube capillaire hépariné (bien que d'autres méthodes de prélèvement de sang, comme la ponction cardiaque, puissent convenir). Le sang est expulsé dans un tube de microcentrifugation (de 1,5 ml de volume, par exemple) et centrifugé pour obtenir le plasma. Les échantillons de plasma sont conservés à une température inférieure ou égale à -70 °C jusqu'à la détermination de la VTG. La VTG plasmatique peut être dosée par la méthode ELISA (appendice 6) ou par une autre méthode telle que la spectrométrie de masse (31). Les anticorps spécifiques de l'espèce sont préférables en raison de leur plus grande sensibilité.

#### *Détermination du sexe génétique*

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

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

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

pendant au moins 48 heures, mais pas plus de 96 heures, après quoi ils sont rincés à l'eau désionisée et stockés dans du formol à 10 % neutre tamponné (1) (29).

### *Histopathologie*

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

## **RAPPORT D'ÉTUDE**

### **Analyse statistique**

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

60. Il est recommandé de s'assurer que le protocole d'essai et le test statistique sélectionné ont une puissance suffisante pour permettre de déceler des changements d'importance biologique concernant les effets pour lesquels une CSEO ou une CEx doit être rapportée. Il est préférable d'effectuer ces analyses statistiques (en règle générale, sur la base de la moyenne des réplicats) en suivant les procédures décrites dans le document de l'OCDE sur les méthodes actuelles d'analyse des données d'écotoxicité (*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*) (33). L'appendice 7 de la présente méthode d'essai illustre l'arbre de décision recommandé pour l'analyse statistique et donne des indications pour le traitement des données, permettant ainsi de choisir le test ou modèle statistique le plus approprié dans le LAGDA.

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

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

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

62. Une mortalité excessive due à une toxicité manifeste, une maladie ou une erreur technique peut compromettre les réplicats et traitements. Si un traitement est compromis par une

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

#### *Témoin avec solvant*

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

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

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

##### *Produit chimique d'essai:*

- État physique et, si nécessaire, propriétés physico-chimiques;
- Substance mono-constituant:

apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;

identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y

a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

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

*Espèce soumise à l'essai:*

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

*Conditions d'essai:*

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

*Résultats:*

- données attestant que les témoins répondent aux critères de validité;

- données relatives au groupe témoin (plus témoin avec solvant le cas échéant) et aux groupes traités: mortalité et anomalies observées, délai jusqu'au stade NF62, histologie de la thyroïde (échantillon de larves uniquement), croissance (poids et longueur), IHS (échantillon de juvéniles uniquement), sex-ratios génotypiques/phénotypiques (échantillon de juvéniles uniquement), résultats de l'histopathologie des gonades, des conduits reproducteurs, des reins et du foie (échantillon de juvéniles uniquement) et de la VTG plasmatique (échantillon de juvéniles uniquement, si mesurée);
  - approche utilisée pour l'analyse statistique et le traitement des données (test ou modèle statistique utilisé);
  - concentration sans effet observé (CSEO) pour chacune des réponses évaluées;
  - concentration minimale avec effet observé (CMEO) pour chacune des réponses évaluées (à  $\alpha = 0,05$ ); CEx pour chacune des réponses évaluées, le cas échéant, et intervalles de confiance (95 %, par exemple), graphique du modèle ajusté utilisé pour calculer la CEx, pente de la courbe concentration-réponse, formule du modèle de régression, estimation des paramètres du modèle et de leurs erreurs-types.
  - tout écart par rapport à la méthode d'essai et aux critères d'acceptation; considérations relatives aux conséquences susceptibles d'en découler pour les résultats de l'essai.
65. En ce qui concerne les résultats de la mesure des effets, on présentera les valeurs moyennes et leurs écarts-types (par réplikat et par concentration, si possible).
66. Le délai médian jusqu'au stade NF62 dans les témoins est calculé et présenté comme la moyenne des médianes dans les réplicats et leur écart-type. De même, pour les traitements, une médiane est calculée et présentée comme la moyenne des médianes dans les réplicats et leur écart-type.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.
- (2) OCDE (2012a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 150) Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.
- (4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. *Journal of Chromatography A* 1130: 16-27.
- (5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Journal of the Royal Society of Medicine* 93: 140-144.
- (6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 237: 1565.
- (7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. *International Journal of Developmental Biology* 34: 281-285.
- (8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. *Zoological Science* 16: 335-340.
- (9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. *Genetics* 48: 1411.
- (10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. *Aquatic Toxicology* 91: 143-150.
- (11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 2469-2474.

- (12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. *General and Comparative Endocrinology* 160: 117-123.
- (13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. *Journal of Neurobiology* 37: 441-448.
- (14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. *Aquatic Toxicology* 84: 321-327.
- (15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. *Aquatic Toxicology* 103: 159-169.
- (16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.
- (17) Chapitre C.4 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité «facile».
- (18) Chapitre C.29 de la présente annexe, Détermination de la biodégradabilité facile – Essai de disparition du CO<sub>2</sub> .
- (19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. *Chemosphere* 39: 539-551.
- (20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. *Chemosphere*, 86(6): 593-9.
- (21) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 23), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (22) 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.
- (23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

- (24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.
- (25) Chapitre C.38 de la présente annexe, Essai de métamorphose des amphibiens.
- (26) Chapitre C.48 de la présente annexe, Essai à court terme de reproduction des poissons.
- (27) Chapitre C.41 de la présente annexe, Essai de développement sexuel des poissons.
- (28) Chapitre C.49 de la présente annexe, Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire.
- (29) OCDE (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No 82) Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.
- (31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.
- (32) OCDE (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 228), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (33) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment (No 54), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

## Appendice 1

### DÉFINITIONS

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

**Produit chimique:** une substance ou un mélange

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

**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 déterminée.

**jpf:** jours post-fécondation

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

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

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

**Concentration minimale avec effet observé (C<sub>MEO</sub>):** concentration la plus basse d'un produit chimique d'essai 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 C<sub>MEO</sub> devraient avoir un effet nocif supérieur ou égal à celui observé à la C<sub>MEO</sub>. Si ces deux conditions ne sont pas réunies, il convient de justifier de façon détaillée le choix de la C<sub>MEO</sub> (et donc de la C<sub>SEO</sub>). L'appendice 7 donne des indications à ce sujet.

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

**Concentration sans effet observé (C<sub>SEO</sub>):** concentration d'essai immédiatement inférieure à la C<sub>MEO</sub> qui, par comparaison avec un témoin, n'a pas d'effet statistiquement significatif (à  $p < 0,05$ ), durant une période d'exposition déterminée.

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

**Produit chimique d'essai:** toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode.

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

ou matériels biologiques.

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

## Appendice 2

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

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

### Appendice 3

#### CONDITIONS D'ESSAI POUR LE LAGDA

1. Espèce soumise à l'essai	<i>Xenopus laevis</i>
2. Type d'essai	Dynamique (flux continu)
3. Température de l'eau	La température nominale est de 21 °C. La température moyenne pendant toute la durée de l'essai est de $21 \pm 1$ °C (les différentiels interréplicat et intertraitement n'excèdent pas 1,0 °C)
4. Qualité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (à large spectre) 600-2000 lux (lumens/m <sup>2</sup> ) à la surface de l'eau
5. Photopériode	12 h de lumière pour 12 h d'obscurité
6. Volume de la solution d'essai et récipient d'essai (cuve)	4-10 l (profondeur de l'eau de 10–15 cm minimum) Cuve de verre ou d'acier inoxydable
7. Renouvellement de la solution d'essai, en volume	Constant, afin de garantir la stabilité des conditions biologiques et de l'exposition chimique (5 renouvellements du vivier par jour, par exemple)
8. Âge des organismes d'essai au démarrage	Stade 8-10 d'après Nieuwkoop et Faber (NF)
9. Nombre d'organismes par réplicat	20 animaux (embryons)/cuve (réplicat) au début de l'exposition puis 10 animaux (juvéniles)/cuve (réplicat) à partir du stade NF66 jusqu'à la fin de l'exposition
10. Nombre de traitements	Minimum de 4 traitements par le produit chimique d'essai plus témoin(s) approprié(s)
11. Nombre de réplicats par traitement	4 réplicats de par traitement contenant le produit chimique d'essai et 8 réplicats pour le(s) témoin(s)
12. Nombre d'organismes par concentration d'essai	Minimum de 80 animaux par traitement pour le produit chimique d'essai et minimum de 160 réplicats pour le(s) témoin(s)
13. Eau de dilution	Toute eau permettant la croissance et le développement normaux de <i>X. laevis</i> (eau de source ou eau du robinet filtrée sur charbon, par exemple)
14. Aération	Aucune aération exigée. L'aération des cuves peut néanmoins se révéler nécessaire si les niveaux d'oxygène dissous tombent en-deçà des limites recommandées et si le flux de solution d'essai est

- porté au maximum.
15. Oxygène dissous de la solution d'essai Oxygène dissous:  $\geq 40$  % de la valeur de saturation en air ou  $\geq 3,5$  mg/l
16. pH de la solution d'essai 6,5-8,5 (les différentiels interréplicat et intertraitement n'excèdent pas 0,5)
17. Dureté et alcalinité de la solution d'essai 10-250 mg CaCO<sub>3</sub>/l
18. Régime alimentaire (voir appendice 4)
19. Période d'exposition Du stade 8-10 jusqu'à dix semaines après le délai médian jusqu'au stade NF62 dans le groupe témoin contenant l'eau de dilution et/ou le solvant (maximum 17 semaines)
20. Effets biologiques mesurés Mortalité (et anomalies morphologiques), délai jusqu'au stade NF62 (échantillon de larves), histologie de la thyroïde (échantillon de larves), croissance (poids et longueur), indice hépato-somatique (échantillon de juvéniles), sex-ratios génotypiques/phénotypiques (échantillon de juvéniles), histopathologie des gonades, des conduits reproducteurs, des reins et du foie (échantillon de juvéniles) et vitellogénine plasmatique (échantillon de juvéniles, optionnel)
21. Critères de validité de l'essai Concentration d'oxygène dissous  $> 40$  % de la valeur de saturation en air; température moyenne de l'eau de  $21 \pm 1$  °C et différentiels interréplicat et intertraitement  $< 1,0$  °C; pH de la solution d'essai entre 6,5 et 8,5; mortalité dans le témoin  $\leq 20$  % dans chaque réplicat, et délai moyen jusqu'au stade NF62 dans le témoin  $\leq 45$  jours; poids moyen des organismes d'essai au stade NF62 et à la fin de l'essai dans les témoins et les témoins avec solvant (si un solvant est utilisé) de  $1,0 \pm 0,2$  et  $11,5 \pm 3$  g, respectivement; les données disponibles démontrent que la concentration du produit chimique d'essai en solution a été correctement maintenue dans un intervalle de  $\pm 20$  % autour des valeurs moyennes mesurées.

## Appendice 4

### RÉGIME ALIMENTAIRE

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

#### Alimentation des larves

##### *Préparation des aliments à administrer aux larves*

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

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

##### *Protocole alimentaire*

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

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

Temps* (post-fécondation)	Nourriture de départ pour truites:algues/TetraFin® (ou équivalent)		Artémies	
	Semaine (3 fois par jour)	Week-end (1 fois par jour)	Semaine (2 fois par jour)	Week-end (1 fois par jour)
<b>J4-14</b> (des semaines 0-1)	0,33 ml	1,2 ml	0,5 ml (J8-15)	0,5 ml (J8-15)

<b>semaine 2</b>	0,67 ml	2,4 ml	1 ml (à partir de J16)	1 ml (à partir de J16)
<b>semaine 3</b>	1,3 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
<b>semaine 4</b>	1,5 ml	4,0 ml	1 ml	1 ml
<b>semaine 5</b>	1,6 ml	4, ml	1 ml	1 ml
<b>semaine 6</b>	1,6 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
<b>semaine 7</b>	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml
<b>semaines 8-10</b>	1,7 ml	4,6 ml	1 ml	1 ml

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

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

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

### Alimentation des juvéniles

#### *Régime alimentaire des juvéniles*

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

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

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

#### *Protocole alimentaire*

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

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

**Tableau 2:** Régime alimentaire des juvéniles de *X. laevis* dans des conditions d'essai dynamique. Il

convient de noter que les animaux non métamorphosés, y compris ceux dont la métamorphose a été retardée par le traitement chimique, ne peuvent pas manger de granulés non broyés.

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

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

## Appendice 5

### DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE (SEXAGE GÉNÉTIQUE)

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

#### Amorces de *X. laevis*

##### Marqueurs DM-W

Sens: 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

Antisens: 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

##### Témoin positif

Sens: 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

Antisens: 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

#### Purification de l'ADN

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

#### PCR

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

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

Mélange maître	1x (µl)	[Final]
Eau stérile exempte de nucléase	11	-
Tampon 10X	2,0	-
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2,0	2,5 mM

dNTP (10mM chacun)	0,4	200 $\mu$ M
Marqueur amorce sens (8 $\mu$ M)	0,8	0,3 $\mu$ M
Marqueur amorce anti-sens (8 $\mu$ M)	0,8	0,3 $\mu$ M
Témoin amorce sens (8 $\mu$ M)	0,8	0,3 $\mu$ M
Témoin amorce antisens (8 $\mu$ M)	0,8	0,3 $\mu$ M
JumpStart™ Taq	0,4	0,05 units/ $\mu$ l
Matrice d'ADN	1,0	~200 pg/ $\mu$ l

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

*Réaction:*

Mélange	19,0 $\mu$ l
Matrice	1,0 $\mu$ l
Total	<u>20,0 <math>\mu</math>l</u>

*Profil du thermocycleur:*

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

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

**Électrophorèse sur le gel d'agarose (3%) (protocole-type)**

*TAE 50X*

Tris	24,2 g
Acide acétique glacial	5,71 ml

Na<sub>2</sub> (EDTA)·2H<sub>2</sub>O      3,72 g

Ajouter de l'eau jusqu'à 100 ml

#### *TAE 1X*

H<sub>2</sub>O                      392 ml

TAE 50X                8 ml

#### *3:1 Agarose*

3 parties d'agarose NuSieve™ GTG™

1 partie d'agarose de Fisher à électroendosmose (EEO) faible

#### *Méthode*

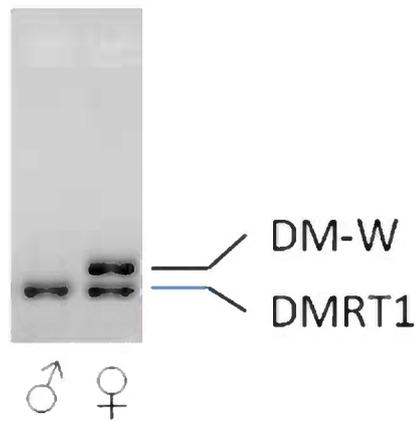
1. Préparer un gel 3 % en ajoutant 1,2 g du mélange d'agarose à 43 ml de TAE 1X. Agiter afin de fragmenter les agrégats.
2. Faire chauffer le mélange d'agarose au micro-ondes pendant 2 minutes jusqu'à sa dissolution complète (en évitant de le laisser déborder). Laisser refroidir légèrement.
3. Ajouter 1,0 µl de bromure d'éthidium (10 mg/ml). Agiter le flacon. Le bromure d'éthidium étant un produit mutagène, il est possible de le remplacer par d'autres produits à cette étape afin de réduire au maximum les risques pour la santé des travailleurs.<sup>1</sup>
4. Verser le gel dans un moule avec un peigne. Laisser refroidir complètement.
5. Ajouter le gel dans l'appareil. Recouvrir le gel de TAE 1X.
6. Ajouter 1 µl de 6x colorant de dissociation à chaque volume de 10 µl de produit PCR.
7. Transférer les échantillons à la pipette dans les puits.
8. Effectuer l'électrophorèse à 160 V constants pendant ~20 minutes.

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

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

---

<sup>1</sup> Conformément à l'article 4, paragraphe 1 de la directive 2004/37/CE du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 concernant la protection des travailleurs contre les risques liés à l'exposition à des agents cancérogènes ou mutagènes au travail (sixième directive particulière au sens de l'article 16, paragraphe 1, de la directive 89/391/CEE du Conseil), JO L 158 du 30.4.2004, p. 50).



## BIBLIOGRAPHIE

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

## Appendice 6

### DOSAGE DE LA VITELLOGÉNINE

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

#### Matériel et réactifs

- Sérum contenant le 1<sup>er</sup> anticorps (Ac) préadsorbé

Mélanger 1 mesure de sérum contenant le 1<sup>er</sup> anticorps anti-VTG de *X. tropicalis* à 2 mesures de plasma de mâles issus du groupe témoin puis laisser reposer à température ambiante pendant ~ 75 minutes, placer sur de la glace pendant 30 min, centrifuger à plus de 20K x G pendant 1 heure à 4 °C, retirer le surnageant, aliquoter et conserver à -20 °C.

- 2<sup>e</sup> anticorps

Conjugué IgG de chèvre anti-lapin-peroxydase de raifort (HRP) (Bio-Rad 172-1019, par exemple)

- Étalon de VTG

VTG purifiée de *X. laevis* à 3.3 mg/ml.

- TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) (KPL 50-76-00; Sigma T0440, par exemple)
- Sérum de chèvre (NGS) (Chemicon® S26-100ml, par exemple)
- Plaques de microtitration 96 puits en polystyrène EIA (ICN: 76-381-04, Costar:53590, Fisher:07-200-35, par exemple)
- Four à hybridation à 37 °C (ou incubateur à air à équilibrage rapide) pour plaques, bain-marie pour tubes
- Autres équipements, produits chimiques et ressources couramment utilisés en laboratoire.

#### Recettes

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

NaHCO<sub>3</sub>      1,26 g

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,68 g
eau	428 ml

*PBS 10X (0,1 M de phosphate, 1,5 M de NaCl):*

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,83 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	20,1 g
NaCl	71 g
eau	810 ml

*Tampon de lavage (PBST):*

PBS 10X	100 ml
eau	900 ml

Rééquilibrer le pH à 7,3 avec 1 M de HCl, puis ajouter 0,5 ml de Tween-20

*Tampon d'essai:*

Sérum de chèvre (NGS)	3,75 ml
Tampon de lavage	146,25 ml

### **Prélèvement des échantillons**

Le sang est collecté au moyen d'un tube capillaire hépariné pour micro-hématocrites puis placé sur de la glace. Après centrifugation pendant 3 minutes, le tube est marqué, ouvert, et le plasma expulsé dans des tubes de centrifugation de 0,6 ml contenant 0,13 unité d'aprotinine lyophilisée. (Ces tubes sont préparés à l'avance par ajout de la quantité appropriée d'aprotinine, congélation et lyophilisation dans un concentrateur à vide à faible température jusqu'à séchage complet.) Enfin, le plasma est conservé à -80 °C jusqu'à l'analyse.

### **Procédure pour une plaque**

*Revêtement de la plaque*

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

*Blocage de la plaque*

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

#### *Préparation des solutions étalons*

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

#### *Préparation des échantillons*

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

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

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

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

#### *Lavage de la plaque*

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

### *Chargement de la plaque*

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

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

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

### *Ajout d'un substrat*

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

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

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

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

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

### *Détermination des seuils minimaux de détection*

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

l'intérieur ou au-dessus de l'intervalle de confiance du seuil minimal de détection, la valeur calculée sera notée. Si un échantillon est compris entre l'étalon zéro et les intervalles du seuil minimal de détection, la moitié du seuil minimal de détection est notée en ce qui concerne la valeur de cet échantillon.

## **BIBLIOGRAPHIE**

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

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 123: 113-125.

## Appendice 7

### ANALYSE STATISTIQUE

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

#### **Données continues**

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

#### *Mortalité*

Les données relatives à la mortalité sont analysées pendant toute la durée de l'essai et sont exprimées en proportions de décès dans un vivier particulier. Les têtards qui ne se métamorphosent pas complètement dans le délai imparti, les têtards qui font partie de la cohorte de sous-échantillons de larves, les grenouilles juvéniles qui sont sélectionnées ainsi que tout décès dû à une erreur expérimentale sont traités comme des données censurées et ne figurent pas au dénominateur du rapport qui détermine le pourcentage. Avant toute

analyse statistique, les proportions de décès font l'objet d'une transformation arc-sinus de la racine carrée. Il est également possible d'utiliser le test de Cochran-Armitage, éventuellement avec correction de type Rao-Scott en cas de surdispersion.

#### *Poids et longueur (données relatives à la croissance)*

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

#### *Indice hépato-somatique (IHS)*

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

#### **Délai jusqu'au stade NF62**

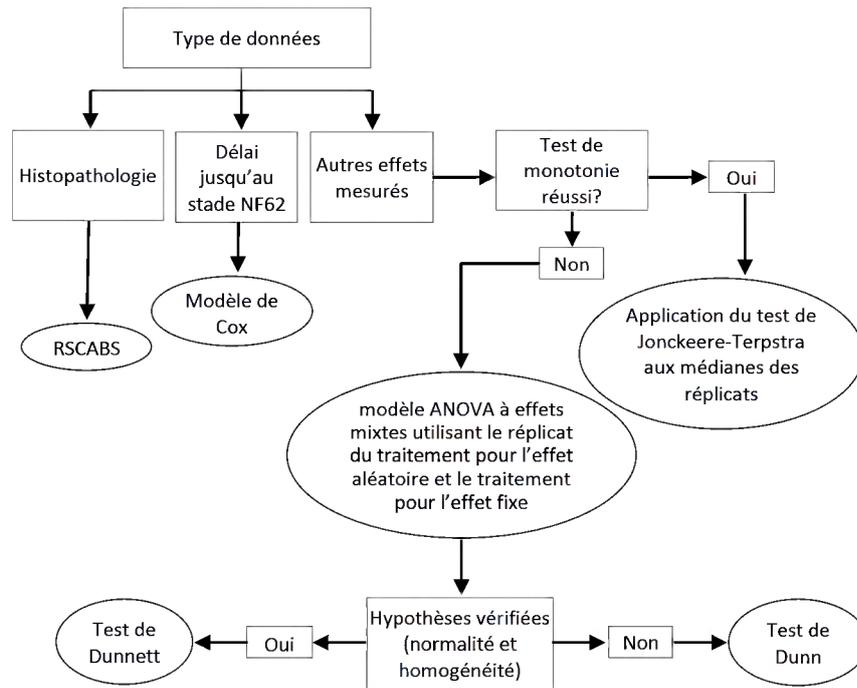
Les données relatives au temps écoulé jusqu'à la métamorphose sont traitées comme des données de type «délai avant événement»; les décès ou individus n'atteignant pas le stade NF62 en 70 jours sont traités comme des données censurées à droite (la valeur réelle est supérieure à 70 jours, mais l'étude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

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

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

retard de développement ou à une accélération du développement. D'où la nécessité d'analyser les données relatives au stade de développement comme indiqué afin de détecter une éventuelle accélération du développement, puis de les inverser manuellement avant de procéder à une deuxième analyse en vue de détecter un éventuel retard de développement.

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



## BIBLIOGRAPHIE

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

## Appendice 8

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

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

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

(NR) non remarquable: absence de courbure

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

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

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

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

#### **Données historiques relatives au frai**

En règle générale, des adultes en bonne santé et de qualité supérieure sont utilisés comme couples reproducteurs; l'élimination des couples reproducteurs dont la progéniture présente une scoliose peut atténuer l'apparition de cette pathologie au fil du temps. Plus précisément, il y a sans doute lieu de recourir le moins possible à des couples reproducteurs capturés dans

la nature. La période d'exposition du LAGDA commence avec des embryons au stade 8-10, et il n'est pas possible de savoir, au début de l'essai, si les individus en question présenteront une scoliose. Ainsi, outre le suivi de l'incidence de la scoliose chez les animaux utilisés pour l'essai, les données historiques relatives à la ponte (y compris la prévalence de la scoliose chez les larves autorisées à se développer) doivent être notées. Il peut être utile de continuer à surveiller la portion de chaque ponte non utilisée dans une étude donnée et de rendre compte de ces observations (FIFRA SAP 2013).

### Qualité de l'eau

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

### Régime alimentaire

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

## BIBLIOGRAPHIE

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

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

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

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

11: 445-453.

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

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