

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

Essai de développement sexuel des poissons

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice (LD) découle d'une décision de 1998 visant à réviser les Lignes directrices de l'OCDE existantes ou à élaborer de nouvelles Lignes directrices concernant les essais de dépistage et les essais plus poussés de perturbateurs endocriniens potentiels. L'essai de développement sexuel des poissons (EDSP) a été identifié comme une méthode d'essai prometteuse couvrant un stade de la vie sensible chez les poissons et réceptif à la fois aux œstrogènes et aux androgènes. De 2006 à 2010, cette méthode d'essai a fait l'objet d'un programme de validation inter-laboratoires qui a permis la validation du medaka japonais (*Oryzias latipes*), du poisson-zèbre (*Danio rerio*) et de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) et la validation partielle du tête-de-boule (*Pimephales promelas*) (41) (42) (43). Ce protocole inclut le medaka japonais, le poisson-zèbre et l'épinoche. Ce protocole vient, en principe, enrichir la LD 210 : *Poisson, Essai de Toxicité aux Premiers Stades de la Vie* (1), avec une exposition maintenue jusqu'à la différenciation sexuelle des poissons, soit pendant les quelque 60 jours qui suivent l'éclosion pour le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre (la période d'exposition peut être plus courte ou plus longue pour d'autres espèces validées ultérieurement), et avec l'ajout des effets observés sur le système endocrinien. L'EDSP évalue les effets aux premiers stades de la vie et les effets néfastes possibles de perturbateurs endocriniens potentiels (œstrogènes, androgènes et inhibiteurs de la stéroïdogenèse, par exemple) sur le développement sexuel. La combinaison des deux principaux effets observés sur le système endocrinien, la concentration de vitellogénine (VTG) et le ratio mâles/femelles phénotypique, permet à l'essai d'indiquer le mode d'action de la substance d'essai. Étant donné que les évolutions du ratio mâles/femelles sont caractéristiques d'une population donnée, l'EDSP peut être utilisé pour l'évaluation des dangers et des risques. Cependant, si le test est utilisé à des fins d'évaluation des dangers et des risques, l'épinoche ne devrait pas être utilisée car les données de validation disponibles à ce jour ont montré que chez cette espèce les altérations du ratio mâles/femelles phénotypiques sont atypiques.

2. Ce protocole s'appuie sur l'exposition de poissons exposés via de l'eau à des substances chimiques durant la période sexuelle labile, au cours de laquelle les poissons peuvent être extrêmement sensibles aux effets des perturbateurs endocriniens qui interfèrent dans le développement sexuel. Deux effets principaux sont mesurés pour indiquer les aberrations du développement liées au système endocrinien, les concentrations de VTG et les ratios mâles/femelles déterminés via l'histologie gonadique. L'histopathologie gonadique (évaluation et classement par stade des ovocytes et des cellules spermatogénétiques) est optionnelle. De plus, le sexe génétique est déterminé si possible (chez le medaka japonais et l'épinoche, par exemple). La présence d'un marqueur du sexe génétique présente un avantage considérable car elle permet d'améliorer la puissance statistique des effets mesurés sur le ratio mâles/femelles et permet la détection du changement de sexe phénotypique chez chaque individu. Les autres effets apicaux à mesurer sont le taux d'éclosion, la survie, la longueur et le poids corporel. On pourrait envisager d'adapter cette méthode d'essai à d'autres espèces que celles mentionnées précédemment à condition que ces autres espèces fassent l'objet d'une validation équivalente à celle effectuée pour le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre, que les poissons témoins soient sexuellement différenciés à la fin de l'essai, que les niveaux de VTG soient suffisamment élevés pour que l'on puisse détecter des

© OCDE, (2011).

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

variations significatives dues à la substance, et que la sensibilité du système expérimental soit établie par le biais de perturbateurs endocriniens de référence ((anti)-œstrogènes, (anti)-androgènes, inhibiteurs de l'aromatase, etc.). De plus, il convient que tout rapport de validation faisant référence à des données de l'EDSP utilisant d'autres espèces soit examiné par l'OCDE, et que le résultat de la validation soit considéré comme satisfaisant.

Remarques Préliminaires et Limites de L'essai

3. La VTG est normalement produite par le foie des femelles vertébrées ovipares en réponse à la circulation d'œstrogènes endogènes (2). Il s'agit d'un précurseur des protéines du vitellus, produit par le foie puis acheminé par le sang vers les ovaires, où il est capté et modifié par les ovocytes en croissance. La synthèse de la VTG est très limitée, quoique détectable, chez les poissons immatures et les poissons mâles adultes car la circulation des œstrogènes n'y est pas suffisante. Néanmoins, le foie peut synthétiser et sécréter la VTG en réponse à une stimulation œstrogénique exogène (3) (4) (5).

4. La mesure de la VTG sert à détecter les substances ayant des modes d'action œstrogéniques, anti-œstrogéniques, et androgéniques, ainsi que les substances qui interfèrent dans la stéroïdogenèse, telles que les inhibiteurs de l'aromatase. Cette détection peut se faire par la mesure de l'induction de VTG chez les poissons mâles ; elle a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques dans des revues à comité de lecture. L'induction de VTG a également été démontrée suite à une exposition à des androgènes aromatisables (6) (7). La diminution du taux d'œstrogènes circulants chez les femelles sous l'effet, par exemple, de l'inhibition de l'aromatase, l'enzyme permettant de convertir l'androgène endogène en œstrogène naturel (17 β -œstradiol), engendre une diminution du niveau de VTG utilisée pour détecter les substances dont les propriétés inhibent l'aromatase ou, plus largement, les inhibiteurs de la stéroïdogenèse (33). La pertinence biologique de la réponse donnée par la VTG suite à l'inhibition des œstrogènes/de l'aromatase est établie et a été abondamment étudiée (8) (9). Néanmoins la production de VTG chez les femelles peut également être affectée par une toxicité générale et des modes d'action toxiques non-endocriniens.

5. Plusieurs méthodes de mesure ont été développées avec succès et normalisées en vue d'essais de routine pour quantifier la VTG dans le sang, le foie, des échantillons d'homogénats de l'ensemble du corps ou de tête-queue prélevés individuellement sur des poissons. C'est le cas du poisson-zèbre, de l'épinoche, du medaka japonais, du tête-de-boule, une espèce partiellement validée, pour lesquels les méthodes ELISA (procédé immuno-chimique d'absorption enzymatique) utilisant l'immuno-chimie pour la quantification de la VTG sont disponibles (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Chez le medaka japonais et le poisson-zèbre, il existe une bonne corrélation entre les concentrations de VTG mesurées dans le plasma sanguin, le foie et les échantillons d'homogénats bien que les homogénats aient tendance à donner des valeurs légèrement inférieures au plasma (17) (18) (19). Les procédures recommandées pour les prélèvements effectués en vue du dosage de la VTG sont décrites dans l'[annexe 4](#).

6. L'évolution du ratio mâles/femelles constitue un indicateur de changement de sexe. En principe, les œstrogènes, les anti-œstrogènes, les androgènes, les anti-androgènes et les inhibiteurs de la stéroïdogenèse peuvent affecter le ratio mâles/femelles des poissons en développement (20). On a pu constater que ce changement de sexe était partiellement réversible chez le poisson-zèbre (21) suite à l'exposition à des substances de type œstrogénique, tandis qu'un changement de sexe suite à l'exposition à des substances de type androgénique est permanente (30). Le sexe est défini comme féminin, masculin, hermaphrodite (ovocytes et cellules spermatogénétiques dans une seule et même gonade) ou indifférencié chez chaque poisson via l'examen histologique des gonades. Des recommandations sont fournies dans l'[annexe 7](#) et dans le document d'orientation No. 123 (22).

7. Le sexe génétique est examiné via des marqueurs génétiques lorsqu'ils existent dans une espèce de poissons donnée. Chez le medaka japonais, les gènes féminins XX ou masculins XY peuvent être détectés par réaction en chaîne par polymérase (PCR), ou le gène lié à Y du domaine DM (DMY) peut être analysé (DMY négatif ou positif) tel que décrit dans les documents de référence (23) (24). Pour l'épinoche,

il existe une méthode de PCR équivalente pour la détermination du sexe génétique, décrite dans l'[annexe 10](#). Lorsque le sexe génétique peut être individuellement mis en relation avec le sexe phénotypique, l'essai est renforcé et le sexe génétique est donc être déterminé dans des espèces ayant des marqueurs du sexe génétique abondamment étudiés.

8. Les deux principaux effets mesurés sur le système endocrinien, la VTG et le ratio mâles/femelles, peuvent, s'ils sont combinés, démontrer le mode d'action de la substance sur le système endocrinien (tableau 1). Le ratio mâles/femelles est un biomarqueur pertinent en terme de population (25) (26), et pour des modes d'action bien définis, les résultats de l'EDSP peuvent être utilisés pour évaluer les dangers et les risques si cela est jugé opportun par l'agence réglementaire. Ces modes d'action sont actuellement ceux des œstrogènes, androgènes et inhibiteurs de la stéroïdogénèse.

Tableau 1 : réaction des effets mesurés sur le système endocrinien à différents modes d'action de substances : ↑= augmentation, ↓= diminution, -= non recherché.

Modes d'action	VTG ♂	VTG ♀	Ratio mâles/femelles	Références
Agoniste faible des œstrogènes	↑	↑	↑♀ ou ↑indifférenciés	(27) (40)
Agoniste fort des œstrogènes	↑	↑	↑♀ ou ↑indifférenciés, ♂ néant	(28) (40)
Antagoniste des œstrogènes	-	-	↓♀, ↑indifférenciés	(29)
Agoniste des androgènes	↓ ou -	↓ ou -	↑♂, ♀ néant	(28) (30)
Antagoniste des androgènes	-	-	↑♀ ↑hermaphrodites	(31)
Inhibiteur de l'aromatase	↓	↓	↓♀	(33)

9. L'EDSP ne couvrant pas le stade de la reproduction des poissons, il convient d'évaluer les substances susceptibles d'affecter la reproduction à des concentrations plus faibles que le développement sexuel dans un essai qui couvre la reproduction.

10. Certains termes techniques utilisés dans la présente Ligne directrice sont définis dans l'[annexe 1](#).

11. L'essai *in vivo* de développement sexuel des poissons vise à détecter les substances ayant des propriétés androgéniques et œstrogéniques ainsi que des propriétés anti-androgéniques, anti-œstrogéniques et inhibitrices de la stéroïdogénèse. Les phases de validation (1 et 2) de l'EDSP couvraient les œstrogènes, les androgènes et les inhibiteurs de la stéroïdogénèse. Les effets des antagonistes des œstrogènes et des androgènes dans le cadre de l'EDSP sont illustrés dans le tableau 1, mais ces modes d'action font actuellement l'objet d'une littérature moins abondante.

PRINCIPE DE L'ESSAI

12. Dans cet essai, les poissons sont exposés, de l'œuf nouvellement fécondé à l'achèvement de la différenciation sexuelle, à au moins trois concentrations de la substance d'essai dissoute dans de l'eau. L'essai se déroule dans des conditions dynamiques à moins que la substance d'essai ne le permette pas pour des raisons de disponibilité ou de nature (solubilité limitée, par exemple). Au début de l'essai, les œufs nouvellement fécondés (avant division du blastodisque) sont placés dans les enceintes d'essai. Le taux de charge des enceintes est décrit pour chaque espèce au paragraphe 27. Pour les espèces validées, à savoir le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre, l'essai est terminé 60 jours après l'éclosion. À la fin de l'essai, tous les poissons sont euthanasiés sans cruauté. Un prélèvement biologique (plasma sanguin, foie ou homogénat tête-queue) est effectué sur chaque poisson pour l'analyse de la VTG, et la partie restante est fixée pour l'évaluation histologique des gonades visant à déterminer le sexe phénotypique ; l'histopathologie (classement par stade des gonades, gravité de l'hermaphroditisme, par exemple) est optionnelle. Un prélèvement biologique (nageoire anale ou dorsale) pour la détermination du sexe génétique est effectué sur les espèces possédant les biomarqueurs adéquats (annexes 9 et 10).

13. L'annexe 2 donne une vue d'ensemble des conditions d'essai pertinentes spécifiques aux espèces validées : le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

14. Il convient que les résultats d'un essai de toxicité aiguë ou d'un autre essai de toxicité à court terme (LD 215 (34) et LD 210 (1), par exemple), mené de préférence avec l'espèce sélectionnée pour l'essai en question, soient disponibles. Cela suppose que l'hydrosolubilité et la pression de vapeur de la substance d'essai soient connues et qu'une méthode analytique fiable de quantification de la substance dans les enceintes d'essai, avec une précision et une limite de détection connues et consignées par écrit, soit disponible.

15. D'autres informations sont utiles, telles que la formule développée, la pureté de la substance, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le pK_a, le P_{ow} et les résultats d'un essai de biodégradabilité facile (LD 301) (35).

Critères de validité de l'essai

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

- La concentration d'oxygène dissous est maintenue à 60 pour cent au moins de la valeur de la saturation en air (VSA) pendant toute la durée de l'essai
- À aucun moment, durant toute la période d'exposition, la température de l'eau ne diffère de plus de ± 1.5 °C entre les enceintes, et elle demeure dans la plage de température indiquée pour l'espèce étudiée (annexe 2)
- Une méthode validée d'analyse de la substance d'exposition avec une limite de détection bien en-deçà de la plus faible concentration nominale est disponible et les données disponibles démontrent que les concentrations de substance d'essai en solution ont été correctement maintenues dans un intervalle de ± 20 % autour des valeurs moyennes mesurées
- Le taux global de survie des œufs fécondés dans les témoins et, le cas échéant, dans les témoins contenant le solvant, est supérieur ou égal aux limites définies à l'annexe 2.
- Les critères de validité relatifs à la croissance et aux proportions de chaque sexe à la fin de l'essai sont basés sur les données issues des groupes témoins (témoin contenant à la fois le

solvant et l'eau, à moins qu'ils présentent des différences significatives, puis uniquement le solvant)

		Medaka japonais	Poisson-zèbre	Epinoche
Croissance	Poids frais de poissons à sec	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Longueur (longueur standard)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
Ratio mâles/femelles		30-70 %	30-70 %	30-70%

- L'utilisation d'un solvant ne devrait pas avoir d'effet statistique significatif sur la survie, d'effets perturbateurs sur le système endocrinien ni d'autres effets néfastes sur les premiers stades de la vie comme le révèle un témoin solvant

Si l'on observe une déviation par rapport aux critères de validité de l'essai, les conséquences sont analysées en fonction de la fiabilité des données d'essai, et ces analyses sont consignées dans le rapport d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Enceintes d'essai

17. On peut utiliser tout récipient en verre, en acier inoxydable ou en matériau chimiquement inerte. Il convient que les enceintes soient suffisamment grandes pour être en conformité avec les critères de charge donnés ci-dessous. Il est souhaitable de disposer les enceintes expérimentales selon un schéma aléatoire par bloc, chaque traitement étant présent dans chaque bloc, plutôt que de les disposer de façon aléatoire. On protège les enceintes de toute perturbation non voulue.

Choix des espèces de poisson

18. L'[annexe 2](#) regroupe les espèces de poissons recommandées pour cet essai. Les procédures d'inclusion de nouvelles espèces sont décrites dans le paragraphe 2.

Soins des poissons géniteurs

19. Les moyens de maintenir les poissons géniteurs dans des conditions satisfaisantes sont détaillés dans la LD 210 (1). Les poissons géniteurs sont nourris une ou deux fois par jour avec des aliments appropriés.

Manipulation des embryons et des larves

20. Au départ, les embryons et les larves peuvent être exposés à l'intérieur de la cuve principale dans des récipients plus petits en verre ou en acier inoxydable avec des côtés ou des extrémités en treillis permettant à la solution d'essai de traverser le récipient. On peut créer un écoulement non turbulent à travers ces petits récipients en les suspendant à un bras disposé de façon à déplacer le récipient verticalement mais en gardant toujours les organismes submergés.

21. Quand on utilise des récipients, des grillages ou des treillis pour maintenir les œufs à l'intérieur de la cuve principale, ces dispositifs sont enlevés après l'éclosion des larves, sauf si ces treillis ont pour objectif d'éviter aux poissons de s'enfuir. Si l'on doit transférer les larves, on ne les expose pas à l'air et il ne faut pas utiliser un filet pour enlever les poissons des récipients contenant les œufs. Le moment de ce transfert varie selon les espèces et il se peut que le transfert ne soit pas nécessaire.

Eau

22. Pour les essais, on peut utiliser toute eau dans laquelle les espèces étudiées (témoins) ont un taux de survie au moins aussi bon que dans l'eau décrite dans l'annexe 3. Il convient que sa qualité demeure constante pendant la durée de l'essai. On prélève et analyse régulièrement des échantillons afin de s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment le résultat des essais (par exemple par réaction avec la substance d'essai) ou n'influencera pas négativement la performance des géniteurs. Le carbone organique total, la conductivité, le pH et les matières en suspension sont dosés par exemple tous les trois mois dans le cas d'une eau de dilution de qualité relativement constante. Les métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple), les anions et cations principaux (Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄, par exemple) et les pesticides sont dosés si la qualité de l'eau est discutable. L'analyse chimique et la collecte d'eau sont détaillées dans le paragraphe 34.

Solutions d'essai

23. Il convient d'utiliser un système dynamique si cela est possible d'un point de vue pratique. Les essais en dynamique nécessitent un système qui délivre et dilue de façon continue une solution-mère de la substance d'essai (par exemple une pompe doseuse, un dilueur proportionnel, un système de saturation) afin de distribuer une série de concentrations vers les enceintes d'essai. Pendant l'essai, on vérifie à intervalles réguliers les débits des solutions-mères et de l'eau de dilution ; ceux-ci ne doivent pas varier de plus de 10 % pendant toute la durée de l'essai. Un débit équivalent à au moins cinq fois le volume de l'enceinte d'essai par 24 heures s'est révélé adéquat (1). Il faut veiller à éviter l'utilisation de tubes en plastique ou d'autres types de matériel pouvant contenir des substances biologiquement actives ou adsorber la substance d'essai.

24. La solution-mère est préparée, de préférence, sans l'utilisation de solvants par simple mélange ou agitation de la substance d'essai dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (secouement ou ultrasons, par exemple). Si la substance d'essai est difficile à dissoudre dans l'eau, les procédures décrites dans le document d'orientation No. 23 (36) sont suivies. L'utilisation de solvants est à éviter mais peut, dans certains cas, s'avérer nécessaire afin d'obtenir la concentration de solution-mère souhaitée. Le document (36) donne des exemples de solvants appropriés.

25. Les conditions d'essai semi-statiques sont à éviter à moins qu'elles soient justifiées par des arguments irréfutables associés à la substance d'essai (stabilité, disponibilité en quantité limitée, coût ou danger élevé, par exemple). Pour la technique semi-statique, on peut utiliser deux méthodes différentes de renouvellement du milieu. Soit on prépare de nouvelles solutions d'essai dans des récipients propres et on transfère avec précaution les œufs et les larves survivants dans les nouveaux récipients, soit on maintient les organismes d'essai dans les enceintes d'essai tout en changeant quotidiennement une partie (au moins les deux tiers) du milieu d'essai.

DEROULEMENT DE L'ESSAI

Conditions d'exposition

Collecte des œufs et durée

26. Pour éviter les biais génétiques, les œufs sont collectés au sein de trois couples ou groupes reproducteurs minimum, mélangés et sélectionnés au hasard pour démarrer l'essai. Pour l'épinoche, une description de la procédure de fertilisation artificielle est fournie dans l'annexe 11. L'essai démarre aussitôt que possible après que les œufs aient été fécondés, les embryons étant de préférence immergés dans les solutions d'essai avant que la division du blastodisque ne commence ou aussi près que possible après ce stade et pas plus de 12 h après la fécondation. L'essai continue jusqu'à ce que la différenciation sexuelle dans le groupe témoin soit achevée (60 jours après l'éclosion pour le medaka japonais, l'épinoche et le poisson-zèbre).

Charge

27. Au début de l'essai, on utilise au moins 120 œufs fécondés par concentration, répartis dans au moins quatre réplicats (la répartition par racine carrée dans le témoin est acceptée). Les œufs sont répartis au hasard (selon les tableaux statistiques de randomisation) dans les différents traitements. Il convient que le taux de charge (voir annexe 1 pour la définition) soit suffisamment faible pour que la concentration en oxygène dissous puisse être maintenue sans aération directe à au moins 60 % de la valeur de saturation en air. Pour les essais dynamiques, il est recommandé que le taux de charge ne dépasse pas 0.5 g/l sur 24 heures et 5 g/l à un moment quelconque. Au plus tard 28 jours après la fécondation, le nombre de poissons par réplicat est redistribué de telle sorte que chaque réplicat contienne un nombre égal de poissons dans la mesure du possible. En cas de mortalité due à l'exposition, le nombre de réplicats est dûment réduit de sorte que la densité de poissons entre les niveaux de traitement soit maintenue aussi égale que possible.

Lumière et température

28. La photopériode et la température de l'eau sont adaptées à l'espèce testée (voir les conditions expérimentales en annexe 2).

Alimentation

29. La nourriture et l'alimentation sont des points critiques, et pour chaque stade de développement, il est primordial de fournir la nourriture appropriée à des intervalles de temps déterminés et dans des quantités suffisantes pour que la croissance soit normale. La nourriture est donnée *ad libitum* tout en minimisant le surplus. Pour que le taux de croissance soit suffisant, les poissons sont nourris au moins deux fois par jour (éventuellement une fois par jour le week-end), à raison d'un intervalle d'au moins trois heures entre chaque repas. La nourriture et les excréments sont retirés quand cela s'avère nécessaire afin d'éviter l'accumulation de déchets. Au fur et à mesure que l'on acquiert de l'expérience, on améliore continuellement la nourriture et les régimes alimentaires afin d'augmenter le taux de survie et d'optimiser la croissance. On s'efforce donc de faire confirmer le régime proposé par des experts reconnus. Les poissons ne sont plus être nourris durant les 24 heures qui précèdent la fin de l'essai. L'annexe 2 donne des exemples de régimes alimentaires adaptés (voir également *OECD Fish Toxicity Testing Framework* (39)).

Concentrations de la substance d'essai

30. Les concentrations de substances d'essai sont espacées tel que décrit à l'annexe 4. Au moins trois concentrations de la substance d'essai placées dans au moins quatre réplicats sont utilisées. Pour choisir la gamme des concentrations d'essai, on s'inspire de la courbe qui donne la CL₅₀ en fonction de la période d'exposition dans les études de toxicité aiguë. Cinq concentrations de la substance d'essai sont recommandées s'il est prévu d'utiliser les données pour l'évaluation des risques.

31. Il n'est pas nécessaire de tester les concentrations supérieures à 10 % de la CL₅₀ aiguë chez les adultes ou à 10 mg/l, quelle que soit la plus faible. Il convient que la concentration maximale représente 10 % de la CL₅₀ chez les larves/juvéniles.

Témoins

32. Un témoin contenant l'eau de dilution (≥ 4 réplicats) et, si nécessaire, un témoin contenant le solvant (≥ 4 réplicats) sont inclus dans l'essai en plus des concentrations de la substance d'essai. Seuls les solvants pour lesquels on a vérifié qu'ils n'avaient pas d'influence statistique significative sur les effets mesurés durant l'essai sont utilisés dans cet essai.

33. Si un solvant est utilisé, sa concentration finale ne dépasse pas 0.1 ml/l (36) et la concentration est identique dans toutes les enceintes d'essai, sauf le témoin avec l'eau de dilution. Néanmoins, on évitera autant que possible d'utiliser un solvant, sinon on veillera à maintenir les concentrations de solvant à un minimum.

Fréquence des dosages analytiques et des mesures

34. L'analyse chimique de la concentration de la substance d'essai est effectuée avant le démarrage de l'essai afin de vérifier la conformité aux critères de validité. Tous les réplicats sont dosés séparément au début et à la fin de l'essai. Un réplikat par concentration de la substance d'essai est dosé au moins une fois par semaine au cours de l'essai, avec une rotation systématique des réplicats (1, 2, 3, 4, 1, 2...). Si les échantillons sont stockés en vue d'un dosage ultérieur, il convient que la méthode de stockage des échantillons ait été validée en amont. Les échantillons sont filtrés (avec par exemple une dimension de pore de 0.45 µm) ou centrifugés afin de s'assurer que seule la substance en solution est dosée analytiquement.

35. Au cours de l'essai, on mesure l'oxygène dissous, le pH, la dureté totale, la conductivité, la salinité (s'il y a lieu) et la température dans toutes les enceintes d'essai. L'oxygène dissous, la salinité (s'il y a lieu) et la température sont mesurés au moins une fois par semaine; le pH, la conductivité et la dureté sont mesurés au minimum au début et à la fin de l'essai. Il est préférable de surveiller la température en continu dans au moins une enceinte.

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

Observations et mesures

Stade du développement embryonnaire

37. L'exposition démarre aussitôt que possible après la fécondation et avant le début de la division du blastodisque et pas plus de 12 h après la fécondation pour garantir l'exposition dès le début du développement embryonnaire.

Éclosion et survie

38. Il faut observer et dénombrer les éclosions et les survivants au moins une fois par jour. Les embryons, larves et juvéniles morts sont enlevés dès qu'ils sont repérés, du fait qu'ils peuvent se décomposer rapidement et être mis en morceaux par les autres poissons. On fait très attention quand on retire les individus morts afin de ne pas heurter ou léser physiquement les œufs et larves proches qui sont extrêmement délicats et sensibles. Les critères indiquant la mort varient selon le stade de développement :

- pour les œufs : en particulier au début de leur cycle, diminution marquée de la transparence et/ou modification de la coloration, provoquées par la coagulation et/ou la précipitation des protéines et conduisant à un aspect blanc opaque ;
- pour les larves et les juvéniles : immobilité et/ou absence de mouvement respiratoire et/ou absence de battement du cœur et/ou coloration blanche opaque du système nerveux central et/ou absence de réaction à un stimulus mécanique.

Apparence anormale

39. On note le nombre de larves ou de poissons présentant une anomalie corporelle et on décrit l'aspect et la nature de l'anomalie. Il faut savoir que des embryons et larves anormaux surviennent de façon naturelle et que, chez le(s) témoin(s) de certaines espèces, leur proportion peut atteindre plusieurs pour

cent. Les animaux anormaux ne sont retirés des récipients d'essai qu'à leur mort. Cela pouvant néanmoins être contraire à certaines réglementations locales, en cas d'observation de souffrance considérable (effets très graves et mort prévisible de façon fiable), les animaux sont anesthésiés et euthanasiés selon le mode opératoire décrit au paragraphe 44 et comptabilisés en tant de décès pour l'analyse des données.

Comportement anormal

40. Des anomalies telles qu'une hyperventilation, une nage non coordonnée, une immobilité anormale et un comportement alimentaire atypique sont notées lorsqu'elles apparaissent.

Poids

41. À la fin de l'essai, tous les poissons survivants sont euthanasiés (anesthésiés si des prélèvements sanguins doivent être effectués) et pesés individuellement à sec.

Longueur

42. A la fin de l'essai, il est recommandé de mesurer la longueur de chaque individu (longueur standard).

43. Ces observations permettront de disposer pour le rapport d'essai de tout ou une partie des données suivantes :

- mortalité cumulée ;
- nombre de poissons sains à la fin de l'essai ;
- moment du commencement de l'éclosion et de la fin de celle-ci ;
- longueur et poids des animaux survivants ;
- nombre de larves déformées ;
- nombre de poissons présentant un comportement anormal.

Prélèvement sur les poissons

44. Le prélèvement sur les poissons est effectué à la fin de l'essai. Les poissons échantillonnés sont euthanasiés avec, par exemple, du MS-222 (100-500 mg/l tamponnés avec 200 mg/l de NaHCO₃) ou du FA-100 (4-allyl-2-méthoxyphénol: eugénol), et la longueur et le poids frais à sec de chaque individu sont mesurés, ou bien les poissons sont anesthésiés si un prélèvement sanguin doit être effectué (voir paragraphe 49).

Prélèvement pour l'analyse de la VTG et la détermination du sexe via l'évaluation histologique

45. Des prélèvements sont effectués sur tous les poissons, qui sont préparés en vue de l'analyse du sexe et de la VTG. Tous les poissons font l'objet d'une analyse histologique visant à déterminer leur sexe. Pour les dosages de la VTG, un sous-échantillon issu d'au moins 16 poissons de chaque réplicat est accepté. L'analyse de la VTG est effectuée sur un plus grand nombre de poissons si les résultats du sous-échantillon se révèlent imprécis.

46. La procédure de prélèvement pour la détermination de la VTG et du sexe dépend de la méthode d'analyse de la VTG :

Méthode d'analyse de la VTG utilisant un homogénat tête-queue

47. Le poisson est euthanasié. La tête et la queue de chaque poisson sont séparées du reste du corps par incision au scalpel au niveau de la partie antérieure des nageoires pectorales et de la nageoire dorsale (voir Figure 1). La tête et la queue de chaque poisson forment un ensemble qui est pesé, et chaque ensemble tête-queue est numéroté puis congelé dans de l'azote liquide et stocké à une température inférieure ou égale à -70°C pour l'analyse de la VTG. Le reste du corps est numéroté et fixé dans une solution de fixation appropriée pour l'évaluation histologique (22). Cette méthode permet d'évaluer la VTG et l'histopathologie sur chaque individu, et une évolution éventuelle du niveau de VTG peut ainsi être corrélée au sexe phénotypique du poisson ou au sexe génétique (medaka japonais et épinouche) du poisson [pour de plus amples informations, voir le guide d'homogénéisation ([annexe 5](#)) et le guide de quantification de la VTG ([annexe 6](#))].

Méthode d'analyse de la VTG utilisant un homogénat hépatique

48. Le poisson est euthanasié. Le foie est extrait par dissection puis stocké à une température inférieure ou égale à -70°C . Les procédures recommandées pour l'excision du foie et le prétraitement figurent dans La LD 229 (37) ou 230 (38). Les foies sont ensuite homogénéisés séparément tel que décrit dans les LD 229 et 230. Le surnageant collecté sert à doser la VTG par le biais d'une technique ELISA homologue (voir exemple de quantification chez le poisson-zèbre dans l'[annexe 6](#) ou LD 229 pour le medaka japonais). En suivant cette démarche, il est également possible d'obtenir des données sur la VTG et l'histologie gonadique de chaque poisson.

Méthode d'analyse de la VTG utilisant le plasma sanguin

49. Les prélèvements sanguins sur les poissons anesthésiés sont effectués par ponction cardiaque, dans la veine caudale ou par sectionnement de la queue, puis centrifugés à une température de 4°C pour la collecte du plasma. Le plasma est stocké à une température inférieure ou égale à -70°C jusqu'à son utilisation. Le poisson est entièrement euthanasié et fixé pour l'histologie. Les échantillons de plasma et les poissons sont numérotés séparément pour corréler les niveaux de VTG au sexe des poissons.



Figure 1 : Comment couper un poisson pour le dosage de la VTG dans un homogénat tête-queue et l'évaluation histologique de la section médiane.

Détermination du sexe génétique

50. Un prélèvement biologique pour la détermination du sexe génétique est effectué sur chaque poisson appartenant à l'une des espèces possédant les biomarqueurs adéquats. Pour le medaka japonais, la nageoire anale ou la nageoire dorsale est collectée. Le prélèvement tissulaire et la détermination du sexe par réaction en chaîne par polymérase (PCR) sont détaillés dans l'[annexe 9](#). De la même façon, pour l'épinoche, une description de la procédure d'échantillonnage ainsi que de la méthode PCR pour la détermination du sexe génétique est fournie dans l'[annexe 10](#).

Dosage de la VTG

51. Le dosage de la VTG est effectué à l'aide d'une méthode analytique quantitative validée. Il convient de disposer d'informations sur la variabilité intra-essai et inter-essais de la méthode utilisée dans un laboratoire donné. La source de variabilité inter-laboratoires et intra-laboratoire dépend (très probablement) des différents stades de développement de la population de poissons. Étant donnée la variabilité du dosage de la VTG, les CSEO basées exclusivement sur cet effet mesuré sont considérées avec une grande prudence. Différentes méthodes permettent d'évaluer la production de VTG dans les espèces de poissons prises en compte dans cet essai. La méthode ELISA (procédé immunochimique d'absorption enzymatique) constitue une méthode de dosage de la VTG à la fois relativement sensible et spécifique. Des anticorps homologues (de la VTG de la même espèce) et surtout des standards homologues sont utilisés.

Détermination du sexe

52. Selon la procédure de prélèvement de la VTG, le corps entier ou la partie centrale restante de chaque poisson est placé(e) sur une cassette de traitement pré-étiquetée et fixé(e) dans une solution de fixation appropriée pour la détermination histologique du sexe (également pour le classement par stade des gonades, optionnel). L'[annexe 7](#) et le document d'orientation OCDE *Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads* (22) donnent des orientations sur la fixation et l'inclusion. À l'issue du traitement, les poissons sont placés dans un bloc de paraffine. Les individus sont placés dans ce bloc selon l'axe longitudinal. Au moins six coupes longitudinales (3-5 µm d'épaisseur) dans un plan frontal comprenant le tissu gonadal des deux gonades sont faites sur chaque individu. L'intervalle entre ces coupes est de 50 µm environ pour les mâles et de 250 µm environ pour les femelles. Toutefois, étant donné que chaque bloc contient souvent des mâles et des femelles (si plus d'un individu est inclus dans chaque bloc), l'intervalle entre les coupes effectuées dans ces blocs est de 50 µm environ jusqu'à ce que l'on obtienne au moins six coupes des gonades de chaque mâle. Par la suite, l'intervalle entre les coupes peut être augmenté jusqu'à 250 µm environ pour les femelles. Les coupes sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine puis examinées au microscope optique, l'observation étant axée sur le sexe (masculin, féminin, hermaphrodite ou indifférencié). L'hermaphrodisme est défini comme la présence de plus d'un ovocyte dans les testicules par lot de six coupes analysées ou de cellules spermatogéniques dans les ovaires (oui/non). L'histopathologie et le classement par stade des ovaires et des testicules sont optionnels, mais s'ils sont pratiqués, les résultats font l'objet d'une analyse statistique et d'un rapport. Il est intéressant de noter que certaines espèces de poissons ne possèdent pas, à l'état naturel, de paire de gonades entièrement développée et qu'une seule gonade peut être présente (medaka japonais et parfois poisson-zèbre, par exemple). Toutes ces observations sont consignées par écrit.

53. Chez le medaka japonais, le sexe génétique est déterminé en fonction de la présence ou de l'absence du gène qui détermine le sexe masculin chez le medaka, le DMY, qui est situé sur le chromosome Y. Le sexe génotypique du medaka peut être identifié par séquençage du DMY à partir de l'ADN extrait d'un morceau de nageoire anale ou de nageoire dorsale, par exemple. La présence du DMY indique qu'il

s'agit d'un individu de sexe masculin (XY) quel que soit le phénotype, tandis que l'absence de DMY indique qu'il s'agit d'un individu de sexe féminin (XX) quel que soit le phénotype (23). L'[annexe 9](#) donne des recommandations sur la préparation des tissus et la PCR. La détermination du sexe génétique individuellement chez chaque épinoche est également déterminée par analyse PCR, comme décrit dans l'[annexe 10](#).

54. La présence d'hermaphrodites (consulter la définition dans l'[annexe 1](#)) est notée.

Caractères sexuels secondaires

55. Les caractères sexuels secondaires sont contrôlés par le système endocrinien chez des espèces telles que le medaka japonais ; les observations relatives aux caractéristiques physiques des poissons sont donc notées si possible à la fin de l'exposition. Chez le medaka japonais, la formation de tubercules papillaires sur la partie postérieure de la nageoire anale des femelles est sensible aux androgènes. La LD 230 (38) fournit des photos pertinentes des caractères sexuels secondaires de mâles et de femelles androgénisées.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

56. Il importe d'utiliser l'analyse statistique la plus valide pour déterminer l'effet mesuré. Le réplicat est l'unité expérimentale, mais la variabilité entre les réplicats est prise en compte lors de l'analyse statistique. Le diagramme de décision de l'[annexe 8](#) aide à choisir l'analyse statistique la plus adéquate en fonction des caractéristiques des résultats de l'essai. Le niveau de signification statistique est de 0.05 pour tous les effets mesurés pris en compte.

Proportions de sexe et de sexe génétique

57. Les proportions de sexe sont analysées pour évaluer l'effet significatif (DSEO/CME0) de l'exposition via le test de Jonckheere-Terpstra (test des tendances) si la relation dose-réponse est monotone. Si la relation est non monotone, des comparaisons par paires sont effectuées : on utilisera le test de Dunnett si l'on peut obtenir la normalité et une variance homogène. On utilisera le test de Tamhane-Dunnett en cas de variance hétérogène. Sinon on appliquera fidèlement le test de Mann-Whitney avec correction de Bonferroni-Holm. Un diagramme de décision statistique des proportions de sexe figure à l'[annexe 8](#). Les proportions de sexe sont présentées sous forme de tableaux reprenant les proportions de concentration \pm l'écart-type de mâles, de femelles, d'hermaphrodites et d'individus indifférenciés. Il convient de souligner la signification statistique. Des exemples sont présentés dans le rapport de validation de la phase 2 de l'essai de développement sexuel des poissons (42). Le sexe génétique est noté sous forme de pourcentage de changement de sexe phénotypique chez les mâles, les femelles, les hermaphrodites et les individus indifférenciés.

Concentrations de VTG

58. Les concentrations de VTG sont analysées pour évaluer l'effet significatif (DSEO/CME0) de l'exposition. Le test de Dunnett est préférable au test t avec correction de Bonferroni. Si l'on applique une correction de Bonferroni, la correction de Bonferroni-Holm est préférable. Il convient d'accepter une transformation logarithmique de la VTG pour atteindre la normalité et une variance homogène. Ensuite, si la relation dose-réponse est cohérente avec la monotonie, le test de Jonckheere-Terpstra est préférable à n'importe lequel des tests précités. Si l'on utilise le test t, ou le test de Dunnett, il n'est pas nécessaire d'utiliser l'ANOVA, qui utilise le mécanisme du test de Fisher, pour poursuivre. On pourra se reporter au diagramme de décision de l'[annexe 8](#) pour de plus amples informations. Les proportions de sexe sont présentées sous forme de tableaux reprenant les concentrations moyennes \pm l'écart-type de mâles, de femelles, d'hermaphrodites et d'individus indifférenciés séparément. Il convient de souligner la

signification statistique des femelles phénotypiques et des mâles phénotypiques. Des exemples sont présentés dans le rapport de validation de la phase 2 de l'essai de développement sexuel des poissons (42).

Concentrations réelles de substance d'essai

59. Les concentrations réelles de substance d'essai dans les enceintes sont analysées selon les fréquences décrites au paragraphe 34. Les résultats sont notés dans des tableaux sous forme de concentration moyenne \pm l'écart-type sur la base des réplicats ainsi que de la concentration, l'accent étant mis sur les informations sur le nombre d'échantillons et sur les valeurs de concentration aberrantes par rapport à la concentration moyenne des traitements \pm 20 %. Des exemples figurent dans le rapport de validation de la phase 2 de l'essai de développement sexuel des poissons (42).

Interprétation des résultats

60. Les résultats sont interprétés avec prudence lorsque les concentrations de la substance d'essai mesurées en solutions d'essai atteignent des niveaux proches de la limite de détection de la méthode d'analyse.

Rapport

61. Le rapport de l'essai comprend les informations suivantes :

- Substance d'essai : propriétés physico-chimiques pertinentes ; données relatives à l'identification chimique, dont la pureté et la méthode analytique de dosage de la substance d'essai.
- Conditions d'essai : mode opératoire utilisé (dynamique ou semi-statique) ; conception de l'essai comprenant les concentrations de la substance d'essai, la méthode de préparation des solutions-mères (dans une annexe), la fréquence de renouvellement (le solvant et sa concentration sont indiqués si ledit solvant est utilisé) ; concentrations nominales de la substance d'essai, valeurs moyennes mesurées, déviations standard de ces moyennes dans les enceintes d'essai et méthode ayant permis de les obtenir (la méthode analytique utilisée est présentée dans une annexe). Données disponibles devant démontrer que les dosages correspondent aux concentrations de la substance d'essai en solution vraie ; qualité de l'eau dans les enceintes d'essai : pH, dureté, température et concentration d'oxygène dissous ; informations détaillées sur l'alimentation (par exemple type d'aliments, provenance, quantité donnée et fréquence) et analyse des contaminants pertinents (PCB, HAP et pesticides organochlorés, par exemple).
- Résultats : données disponibles démontrant que les témoins ont rempli les critères de validité : les données sur le taux d'éclosion sont présentées sous forme de tableaux indiquant le pourcentage par réplicat et par concentration. Les résultats aberrants par rapport aux critères de validité (dans les témoins) sont soulignés. La survie est présentée sous forme de pourcentage par réplicat et par concentration. Les résultats aberrants par rapport aux critères de validité (dans les témoins) sont soulignés. Indication claire des résultats obtenus par rapport aux différents effets observés : survie des embryons et réussite de l'éclosion ; anomalies externes ; longueur et poids ; dosages de la VTG (ng/g d'homogénat, ng/ml de plasma ou ng/mg de foie) ; données sur l'histologie gonadique, le ratio mâles/femelles et le sexe génétique ; fréquence des réactions inhabituelles des poissons et des effets visibles produits par la substance d'essai.

62. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs moyennes \pm l'écart-type ou l'erreur-type. Les résultats statistiques sont notés au minimum sous forme de DSEO et de CME0 et d'intervalles de confiance. Le diagramme de décision (annexe 8) est suivi.

Références

1. OCDE (1992), *Poisson, Essai de Toxicité aux Premiers Stades de la Vie*, Ligne directrice pour les essais de produits chimiques No. 210, OCDE, Paris.
2. Jobling, S., D. Sheahan, J. A. Osborne, P. Matthiessen, and J. P. Sumpter, 1996, "Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals", *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, pp. 194-202.
3. Sumpter, J. P. and S. Jobling, 1995, "Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment", *Environmental Health Perspectives* 103, pp. 173-178.
4. Tyler, C. R., R. van Aerle, T. H. Hutchinson, S. Maddix, and H. Trip (1999), "An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin", *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, pp. 337-347.
5. Holbeck, H., L. Andersen, G. I. Petersen, B. Korsgaard, K. L. Pedersen, and P. Bjerregaard (2001a), "Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 130, pp. 119-131.
6. Andersen, L., P. Bjerregaard, and B. Korsgaard (2003), "Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disruptors", *Fish Physiology and Biochemistry* 28, pp. 319-321.
7. Orn, S., H. Holbeck, T. H. Madsen, L. Norrgren, and G. I. Petersen (2003), "Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone", *Aquatic Toxicology* 65, pp. 397-411.
8. Panter, G. H., T. H. Hutchinson, R. Lange, C. M. Lye, J. P. Sumpter, M. Zerulla, and C. R. Tyler (2002), "Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances", *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 319-326.
9. Sun, L. W., J. M. Zha, P. A. Spear, and Z. J. Wang (2007), "Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 533-541.
10. Parks, L. G., A. O. Cheek, N. D. Denslow, S. A. Heppell, J. A. McLachlan, G. A. LeBlanc, and C. V. Sullivan (1999), "Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 123, pp. 113-125.
11. Brion, F., B. M. Nilsen, J. K. Eidem, A. Goksoyr, and J. M. Porcher (2002), "Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)", *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, pp. 1699-1708.
12. Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara, and E. Tamiya (2002), "Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 132, pp. 161-169.

13. Hahlbeck,E., I.Katsiadaki, I.Mayer, M.Adolfsson-Erici, J.James, and B.E.Bengtsson (2004), "The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption - II - kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction", *Aquatic Toxicology* 70, pp. 311-326.
14. Tatarazako,N., M.Koshio, H.Hori, M.Morita, and T.Iguchi (2004), "Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka", *Journal of Health Science* 50, pp. 301-308.
15. Eidem,J.K., H.Kleivdal, K.Kroll, N.Denslow, R.van Aerle, C.Tyler, G.Panter, T.Hutchinson, and A.Goksoyr (2006), "Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*", 78, pp. 202-206.
16. Jensen,K.M. and G.T.Ankley (2006), "Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)", *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, pp. 101-105.
17. Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A.,Örn, S, Norrgren, L., and Bjerregaard, P (2001b), "Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597*, pp. 48-51.
18. Nilsen,B.M., K.Berg, J.K.Eidem, S.I.Kristiansen, F.Brion, J.M.Porcher, and A.Goksoyr (2004), "Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, pp. 621-633.
19. Orn,S., S.Yamani, and L.Norrgren (2006), "Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, pp. 237-243.
20. Scholz,S. and N.Kliver (2009), " Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, *Sexual Development* 3, pp. 136-151.
21. Fenske,M., G.Maack, C.Schafers, and H.Segner (2005), " An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*", *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, pp. 1088-1098.
22. OCDE (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OCDE, Paris.*
23. Kobayashi,T., M.Matsuda, H.Kajiura-Kobayashi, A.Suzuki, N.Saito, M.Nakamoto, N.Shibata, and Y.Nagahama (2004), "Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*", *Developmental Dynamics* 231, pp. 518-526.
24. Shinomiya,A., H.Otake, K.Togashi, S.Hamaguchi, and M.Sakaizumi (2004), "Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations", *Zoological Science* 21, pp. 613-619.

25. Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, and R.W. Flick (2007), "Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, pp. 8897-8901.
26. Palace, V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron, and K.A. Kidd (2009), "Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 66, pp. 1920-1935.
27. Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), "Development of chronic tests for endocrine active chemicals - Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)", *Aquatic Toxicology* 77, pp. 279-290.
28. Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren, and P. Bjerregaard (2006), "Detection of endocrine disruptors: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (EDSP)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 144, pp. 57-66.
29. Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard, and P. Bjerregaard (2004), "Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disruptors: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)", *Fish Physiology and Biochemistry* 30, pp. 257-266.
30. Morthorst, J.E., H. Holbech, and P. Bjerregaard (2010), "Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations", *Aquatic Toxicology* 98, pp. 336-343.
31. Kiparissis, Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), "Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)", *Aquatic Toxicology* 63, pp. 391-403.
32. Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley, and C.R. Tyler (2004), "Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development", *Aquatic Toxicology* 70, pp. 11-21.
33. Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen, and P. Bjerregaard (2007), "Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)", *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, pp. 165-170.
34. OCDE (2000), *Poisson, essai sur la croissance des juvéniles*, Ligne directrice pour les essais de produits chimiques No. 215, OCDE, Paris.
35. OCDE (1992), *Biodégradabilité Facile*, Ligne directrice pour les essais de produits chimiques No. 301, OCDE, Paris.
36. OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OCDE, Paris.
37. OCDE (2009), *Essai à court terme de reproduction des poissons*, Ligne directrice pour les essais de produits chimiques No. 229, OCDE, Paris.

38. OCDE (2009), *Essai de 21 jours sur les poissons : Essai de dépistage à court terme de l'activité estrogénique et androgénique, et de l'inhibition de l'aromatase*, Ligne directrice pour les essais de produits chimiques No. 230, OCDE, Paris.
39. OCDE (2011), Fish Toxicity Testing Framework (projet disponible à l'adresse suivante : http://www.oecd.org/document/12/0,3746,en_2649_34377_1898188_1_1_1_1,00.html)
40. Scäfers,C., Teigeler,M., Wenzel,A., Maack,G., Fenske,M., Segner,H (2007), " Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*" *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 70, 9-10 pp 768-779.
41. OCDE (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test, Série sur les essais et l'évaluation* No. 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OCDE, Paris.
42. OCDE (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test, Série sur les essais et l'évaluation* No. 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OCDE, Paris.
43. OCDE (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test, Série sur les essais et l'évaluation* No. 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OCDE, Paris.

ANNEXE 1

ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

Effet apical :	ayant des effets au niveau de la population
VSA :	valeur de la saturation en air
Biomarqueur	ayant des effets au niveau individuel
DMY:	gène lié à Y du domaine DM indispensable au développement des caractères masculins chez le medaka japonais
ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) :	procédé immunochimique d'absorption enzymatique
Poids de poissons :	poids frais de poissons (à sec)
EDSP :	essai de développement sexuel des poissons
Axe HHG :	axe hypothalamo-hypophyso-gonadique
Hermaphrodite :	poisson ayant plus d'un ovocyte dans les testicules par lot de six coupes analysées ou des cellules spermatogéniques dans les ovaires (oui/non)
Taux de charge :	poids frais de poissons par unité de volume d'eau
RT-PCR :	transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne par polymérase
Poisson indifférencié :	poisson dont les gonades sont dénuées de cellules germinales visibles
VTG :	vitellogénine

ANNEXE 2

CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'EDSP (espèces d'eau douce)

1. Espèces recommandées	Medaka japonais (<i>Oryzias latipes</i>)	Poisson-zèbre (<i>Danio rerio</i>)	Epinoche (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
2. Type d'essai	dynamique ou semi-statique	dynamique ou semi-statique	dynamique ou semi-statique
3. Température de l'eau	25± 2°C	27± 2°C	20 ± 2°C
4. Qualité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (à large spectre)	Ampoules fluorescentes (à large spectre)	Ampoules fluorescentes (à large spectre)
5. Intensité de l'éclairage	10-20 µE/m ² /s, 540-1080 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)	10-20 µE/m ² /s, 540-1080 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)	10-20 µE/m ² /s, 540-1080 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire)
6. Photopériode	12-16 h de lumière, 8-12 h d'obscurité	12-16 h de lumière, 8-12 h d'obscurité	16 h de lumière, 8 h d'obscurité
7. Volume minimum des enceintes	Chaque enceinte peut contenir au moins 7 L d'eau	Chaque enceinte peut contenir au moins 7 L d'eau	Chaque enceinte peut contenir au moins 7 L d'eau
8. Remplacement volumique des solutions d'essai	Minimum 5 fois/jour	Minimum 5 fois/jour	Minimum 5 fois/jour
9. Âge des organismes d'essai au début de l'exposition	Œufs nouvellement fécondés (au stade du blastodisque)	Œufs nouvellement fécondés (au stade du blastodisque)	Œufs nouvellement fécondés
10. Nombre d'œufs par traitement	Minimum 120	Minimum 120	Minimum 120
11. Nombre de traitements	Minimum 3 (plus témoins appropriés)	Minimum 3 (plus témoins appropriés)	Minimum 3 (plus témoins appropriés)
12. Nombre de réplicats par traitement	Minimum 4 (sauf répartition par racine carrée dans les témoins)	Minimum 4 (sauf répartition par racine carrée dans les témoins)	Minimum 4 (sauf répartition par racine carrée dans les témoins)
13. Régime alimentaire	Artémies vivantes, nauplies d'artémies adultes congelées, flocons, etc. Il est recommandé de nourrir les poissons deux fois	Friture spéciale, artémies vivantes, nauplies d'artémies adultes congelées, flocons, etc. Il est recommandé de nourrir	Artémies vivantes, nauplies d'artémies adultes congelées, flocons, etc. Il est recommandé de nourrir les poissons deux fois

	par jour.	les poissons deux fois par jour.	par jour.
14. Aération	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 60 % de la valeur de la saturation en air	Pas d'aération sauf si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 70 % de la valeur de la saturation en air
15. Eau de dilution	Eau de surface, de puits ou reconstituée	Eau de surface, de puits ou reconstituée	Eau de surface, de puits ou reconstituée
16. Durée de l'exposition à la substance d'essai	60 jours après l'éclosion	60 jours après l'éclosion	60 jours après l'éclosion
17. Effets biologiques mesurés	Éclosion réussie, survie, morphologie brute, VTG, histologie gonadique, sexe génétique, ratio mâles/femelles	Éclosion réussie, survie, morphologie brute, VTG, histologie gonadique, ratio mâles/femelles	Éclosion réussie, survie, morphologie brute, VTG, histologie gonadique, ratio mâles/femelles
18. Critères de validité de l'essai pour les lots de réplicats des témoins	Éclosion réussie > 80 % Survie après éclosion ≥ 70 % Croissance (poids frais de poissons à sec) >150 mg Longueur (longueur standard) > 20 mm Ratio mâles/femelles de 30 % - 70 %	Éclosion réussie > 80 % Survie après éclosion ≥ 70 % Croissance (poids frais de poissons à sec) >75 mg Longueur (longueur standard) > 14 mm Ratio mâles/femelles de 30 % - 70 %	Éclosion réussie > 80 % Survie après éclosion ≥ 70 % Croissance (poids frais de poissons à sec) >120 mg Longueur (longueur standard) > 20 mm Ratio mâles/femelles de 30 % - 70 %

ANNEXE 3

CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

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

ANNEXE 4

**EXTRAIT DE LA LIGNE DIRECTRICE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUE
No. 215 / ORIENTATIONS SUR LES CONCENTRATIONS DE SUBSTANCE D'ESSAI**

Colonne (Nombre de concentrations entre 100 et 10 ou entre 10 et 1)*						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3.2	10	18	25	32	37	42
1.0	4,6	10	16	22	27	32
	2.2	5.6	10	15	19	24
	1.0	3.2	6.3	10	14	18
		1.8	4.0	6.8	10	13
		1.0	2.5	4.6	7.2	10
			1.6	3.2	5.2	7.5
			1.0	2.2	3.7	5.6
				1.5	2.7	4.2
				1.0	1.9	3.2
					1.4	2.4
					1.0	1.8
						1.3
						1.0

* Une série de trois concentrations successives (ou plus) peut être choisie dans une colonne. Les points intermédiaires entre les concentrations d'une colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées sous forme de pourcentage en volume ou en poids (mg/l ou µg/l). Les valeurs peuvent être multipliées ou divisées par la puissance de 10 adéquate. On pourra utiliser la première colonne si le degré de toxicité est très incertain.

ANNEXE 5

GUIDE D'HOMOGENÉISATION DE LA TÊTE ET DE LA QUEUE DES JUVÉNILES DES ESPÈCES POISSON-ZÈBRE, TÊTE-DE-BOULE, ÉPINOCHÉ À TROIS ÉPINES ET MEDAKA JAPONAIS

Cette partie a pour objet de décrire les procédures qui précèdent la quantification de la concentration de VTG. D'autres procédures permettant un dosage similaire de la VTG peuvent être utilisées. La concentration de VTG peut, de manière optionnelle, être déterminée dans le plasma sanguin ou le foie au lieu d'un homogénat tête-queue.

Procédure

1. Les poissons sont anesthésiés puis euthanasiés conformément à la description de l'essai.
2. La tête et la queue des poissons sont coupées conformément à la description de l'essai. Note importante : *tous les instruments de dissection ainsi que la planche à découper sont rincés et lavés correctement (avec de l'éthanol à 96 %, par exemple) entre chaque manipulation de poisson pour éviter que la vitellogénine des femelles ou des mâles induits ne « pollue » les mâles non-induits.*
3. L'ensemble tête-queue de chaque poisson est pesé au mg prêt.
4. Après avoir été pesés, les morceaux sont placés dans des tubes appropriés (Eppendorf de 1.5 ml, par exemple) et stockés à une température de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à leur homogénéisation ou bien directement homogénéisés sur de la glace avec deux pilons en plastique (d'autres méthodes peuvent être utilisées si elles impliquent de la glace et permettent d'obtenir une masse homogène). Note importante : les tubes sont numérotés correctement de façon que la tête et la queue du poisson puissent être reliées à la partie du corps correspondante utilisée pour l'histologie gonadique.
5. Après obtention d'une masse homogène, on ajoute un tampon d'homogénéisation* glacé représentant 4-10 x la masse pondérale tissulaire (noter la dilution). Continuer à pilonner jusqu'à ce que le mélange soit homogène. Note importante : de nouveaux pilons sont utilisés pour chaque poisson.
6. Les échantillons sont posés sur de la glace jusqu'à centrifugation à 50 000 g pendant 30 min. et à une température de 4°C .
7. Utiliser une pipette pour répartir des portions de **20 à 50 μl** (noter la quantité) de surnageant dans au moins deux tubes en plongeant l'embout de la pipette sous la couche lipidique située à la surface et en aspirant doucement le surnageant sans fraction lipidique ni culot.
8. Les tubes sont stockés à une température de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à leur utilisation.

**Tampon d'homogénéisation :*

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

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

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

ANNEXE 6

GUIDE DE QUANTIFICATION DE LA VITELLOGÉNINE DANS DES HOMOGENATS TÊTE-QUEUE DE POISSON-ZÈBRE (*DANIO RERIO*) (MODIFIÉ À PARTIR DE HOLBECH ET AL., 2001). D'AUTRES PROCÉDURES UTILISANT DES ANTICORPS ET DES STANDARDS HOMOGENES PEUVENT ÊTRE UTILISÉES.

1. Décongeler les plaques de microtitration (certifiées Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Danemark) recouvertes au préalable de 5 mg/ml d'anti-IgG de lipovitelline de poisson-zèbre puis les laver 3 fois avec un tampon de lavage*.
2. Diluer en série le standard de Battelle pour poisson-zèbre AP4.6.04 (1.18 mg/ml (AAA)) à raison de 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 et 20 ng/ml dans un tampon de dilution** et diluer les échantillons au moins 200 fois (pour éviter l'effet de matrice) dans le tampon de dilution puis les poser sur les plaques. Dupliquer un contrôle d'essai. Verser 150 µl dans chaque puits. Dupliquer les standards et tripler les échantillons. Faire incuber pendant une nuit à 4°C sur un agitateur.
3. Laver 5 fois les plaques avec le tampon de lavage*.
4. Diluer HPR associé à une chaîne de dextrane (AMDEX A/S, Danemark, par exemple) et les anticorps conjugués dans le tampon de lavage ; la dilution réelle diffère selon le lot et l'âge. Verser 150 µl dans chaque puits et mettre les plaques en incubation pendant 1 heure à température ambiante sur un shaker.
5. Laver 5 fois les plaques avec le tampon de lavage*, et nettoyer soigneusement le fond des plaques avec de l'éthanol.
6. Verser 150 µl de TMB plus*** dans chaque puits. Protéger les plaques de la lumière avec du papier aluminium puis observer le changement de couleur sur un shaker.
7. Une fois la courbe d'étalonnage obtenue, stopper l'activité enzymatique en versant 150 µl 0.2 M de H₂SO₄ dans chaque puits.
8. Mesurer l'absorbance à hauteur de 450 nm (sur un lecteur de plaque de dispositifs moléculaires Thermomax). Analyser les données sur le logiciel associé (Softmax, par exemple).

*** Tampon de lavage :**

Stock de PBS****	500.0	ml
Sérum d'albumine bovine	5.0	g
Tween 20 : acide laurique	5.0	ml

Rééquilibrer le pH à 7.3 et verser dans 5 l d'eau filtrée sur membrane millipore.. Stocker à 4° C.

****Tampon de dilution**

Stock de PBS****	100.0	ml
Sérum d'albumine bovine	3.0	g
Tween 20 / acide laurique	1.0	ml

Rééquilibrer le pH à 7.3 et verser dans 1 l d'eau filtrée sur membrane millipore. Stocker à 4° C.

*** Le TMB plus est un substrat « prêt à l'emploi » produit par KemEnTec (Danemark). Il est photosensible. Stocker à 4° C.

****** Stock de PBS**

NaCl	160.0	g
KH ₂ PO ₄	4.0	g
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	26.6	g
KCl	4.0	g

Rééquilibrer le pH à 6.8 et verser dans 2 l d'eau filtrée sur membrane millipore. Stocker à température ambiante.

ANNEXE 7

GUIDE DE PRÉPARATION DES COUPES TISSULAIRES POUR LA DÉTERMINATION DU SEXE ET LE CLASSEMENT PAR STADE DES GONADES

Cette partie a pour objet de décrire les procédures qui précèdent l'évaluation des coupes histologiques. D'autres procédures similaires de détermination du sexe et de classement par stade des gonades peuvent être utilisées. À quelques exceptions près, ces procédures sont similaires pour le medaka japonais et le poisson-zèbre.

Euthanasie, autopsie et fixation des tissus*Objectifs :*

1. Euthanasier les poissons sans les faire souffrir.
2. Obtenir les poids corporels et les mesures nécessaires.
3. Évaluer les caractères sexuels secondaires.
4. Disséquer les tissus pour l'analyse de la VTG.
5. Fixer les gonades.

Procédures :

1. Les poissons sont euthanasiés immédiatement avant l'autopsie. Par conséquent, à moins que les prosecteurs soient nombreux, les poissons ne sont pas sacrifiés en nombre simultanément.
2. Transférer un poisson de l'enceinte d'essai vers la zone d'autopsie du conteneur de transport avec l'épuisette.
3. Placer le poisson dans la solution euthanasique. Retirer le poisson de la solution lorsqu'il ne respire plus et qu'il ne répond plus aux stimuli extérieurs.
4. Mesurer le poids frais du poisson.
5. Pour la préparation des tissus à l'analyse de la VTG, le poisson peut être placé sur un carreau de liège sur la plate-forme élevée d'un microscope à dissection.
 - a. Chez le poisson-zèbre, couper la tête juste derrière la nageoire pectorale et la queue juste derrière la nageoire dorsale.
 - b. Chez le medaka japonais, ouvrir l'abdomen en pratiquant soigneusement une incision le long de la ligne médiane allant de l'attache pectorale à un point situé au niveau du côté crânien de l'anus. Exciser délicatement le foie à l'aide de pincettes et de ciseaux.
6. Placer les spécimens pour l'analyse de la VTG dans des tubes Eppendorf et les congeler immédiatement dans de l'azote liquide.
7. Placer la carcasse avec les gonades dans une cassette à tissus en plastique pré-étiquetée qui sera transférée dans un liquide fixateur de Davidson ou de Bouin. Le volume de fixateur est supérieur ou égal à 10 fois le volume approximatif des tissus. Agiter doucement le conteneur avec le fixateur pendant cinq secondes pour évacuer les bulles d'air de la cassette.
8.
 - a. Laisser les tissus dans le fixateur de Davidson pendant une nuit puis les transférer dans des conteneurs individuels de formol tamponné à 10 % le lendemain. Agiter

doucement les conteneurs avec les cassettes pendant 5 secondes pour que le formol pénètre bien dans les cassettes.

- b. Laisser les tissus dans le fixateur de Bouin pendant 24 h puis les transférer dans de l'éthanol à 70 %.

Traitement des tissus

Objectifs :

1. Déshydrater les tissus pour une bonne pénétration de la paraffine.
2. Imprégner les tissus de paraffine pour maintenir l'intégrité des tissus et créer une surface ferme pour la microtomie.

Procédures :

1. Retirer les cassettes étiquetées contenant les tissus du formol/de l'éthanol puis placer les cassettes dans le(s) panier(s) de traitement. Charger le panier dans l'appareil de traitement.
2. Sélectionner le programme de traitement.
3. À la fin du cycle de traitement, le(s) panier(s) peut/peuvent être transféré(s) vers la station d'inclusion.

Inclusion

Objectif :

Placer correctement le spécimen dans la paraffine solidifiée pour la microtomie.

Procédures :

1. Retirer le(s) panier(s) des cassettes de l'appareil puis immerger le(s) panier(s) dans l'enceinte- avant, remplie de paraffine, de la console thermique de la station d'inclusion, ou déplacer les cassettes vers un réchauffeur de paraffine séparé.
2. Retirer la première cassette à inclure de l'enceinte- avant de la console thermique ou du réchauffeur de paraffine. Retirer et mettre au rebut le couvercle de la cassette puis vérifier l'étiquette de la cassette par rapport aux données enregistrées sur les animaux afin de corriger les écarts éventuels avant inclusion.
3. Sélectionner un moule d'inclusion aux dimensions adéquates.
4. Placer le moule sous le bec verseur de la console de distribution et le remplir de paraffine fondue.
5. Retirer le spécimen de la cassette et le placer dans le moule rempli de paraffine fondue. Répéter cette opération avec 4-8 spécimens pour chaque moule de paraffine. Marquer la position de chaque poisson en plaçant le poisson n° 1 à 180 degrés des poissons 2-4/8.
6. Recouvrir le spécimen d'une couche de paraffine supplémentaire.
7. Placer le moule et le fond de la cassette sur la plaque froide de la console cryogénique.
8. Une fois la paraffine solidifiée, démouler le bloc (à savoir la paraffine durcie contenant les tissus et le fond de la cassette).

Microtomie

Objectif :

Réalisation et montage de coupes histologiques en vue de leur coloration.

Procédures :

1. La première phase de la microtomie, appelée « facing » se déroule ainsi :
 - a. Placer le bloc de paraffine dans le porte-bloc du microtome.
 - b. Avancer le porte-bloc en faisant tourner la roue du microtome et effectuer des coupes épaisses à la surface du bloc de paraffine jusqu'à ce que la lame atteigne les tissus inclus.
 - c. Régler l'épaisseur de coupe du microtome sur 3-5 microns. Avancer le porte-bloc et réaliser de nombreuses coupes dans le bloc pour supprimer les éventuels phénomènes parasites provoqués à la surface de coupe du tissu lors de la préparation.
 - d. Retirer le bloc du porte-bloc et le placer à l'envers sur de la glace pour détremper le tissu.
2. La phase suivante de la microtomie correspond à la réalisation des coupes finales et à la confection des lames. La procédure est la suivante :
 - a. Si le bloc a été placé sur de la glace, retirer le bloc de la glace puis le replacer dans le porte-bloc du microtome.
 - b. L'épaisseur de coupe étant réglée sur 3-5 microns, avancer le porte-bloc en faisant tourner la roue du microtome. Confectionner un « ruban » de coupes comptant au moins une coupe acceptable comprenant les gonades. (Si nécessaire, pendant la réalisation des coupes, retirer le bloc du porte-bloc, le placer sur de la glace pour détremper le tissu puis le replacer dans le porte-bloc).
 - c. Déplisser les coupes par flottaison à la surface du bain-marie. Essayer d'obtenir au moins une coupe sans plis et sans bulles d'air emprisonnées en dessous.
 - d. Immerger une lame sous la meilleure coupe puis sortir celle-ci de l'eau à l'aide de la lame. Ce procédé est appelé « montage » de la coupe sur la lame ou « confection des lames ».
 - e. Préparer trois coupes pour un ensemble de poissons. Effectuer la deuxième et la troisième coupe à 50 microns d'intervalle de la première. Si les poissons ne sont pas inclus avec leurs gonades dans le même niveau de coupe, effectuer plus de coupes pour s'assurer qu'au moins six coupes comprenant les gonades sont obtenues de chaque poisson.
 - f. Noter sur la lame, à l'aide d'un marqueur spécial, le numéro du bloc à partir duquel la lame a été confectionnée.
 - g. Placer la lame sur un support pour coloration de lames.
 - h. Retirer le bloc du porte-bloc puis le placer à l'envers pour stockage.

*Coloration, application des lamelles et étiquetage des lames**Objectifs :*

- Coloration des coupes en vue de l'analyse histopathologique
- Coloration et montage étanche permanents des tissus
- Identification permanente des coupes colorées de manière à assurer une traçabilité parfaite.

Procédures :

1. Coloration
 - a. Laisser sécher les lames à l'air libre toute une nuit avant leur coloration.
 - b. Colorer les coupes à l'hématoxyline-éosine.
2. Application des lamelles
 - a. Les lamelles peuvent être appliquées manuellement ou automatiquement.
 - b. Tremper une lame dans du xylène ou du TissueClear®, puis retirer délicatement l'excès de xylène/TissueClear® de la lame.
 - c. Appliquer 0.1 ml environ de medium de montage près du bord de la lame à l'opposé du bord dépoli ou sur la lamelle.
 - d. Appliquer la lamelle sur la lame en l'inclinant légèrement.
3. Étiquetage des lames
 - a. Chaque étiquette contient les informations suivantes :
 - i. Nom du laboratoire
 - ii. Espèce
 - iii. Spécimen n° / lame n°
 - iv. Groupe de traitement chimique
 - v. Date

ANNEXE 8

Diagramme de décision statistique pour l'analyse de la vitellogénine

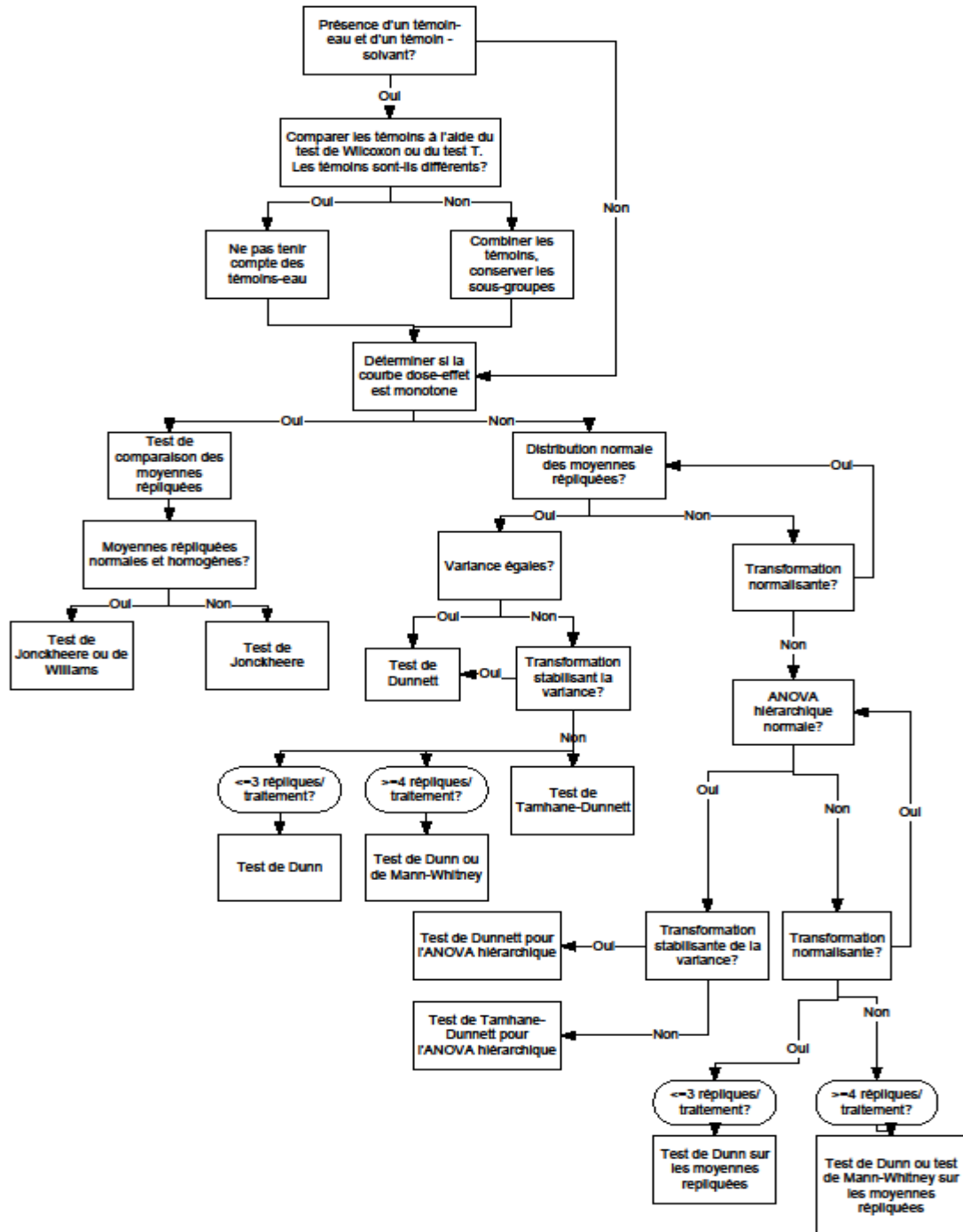
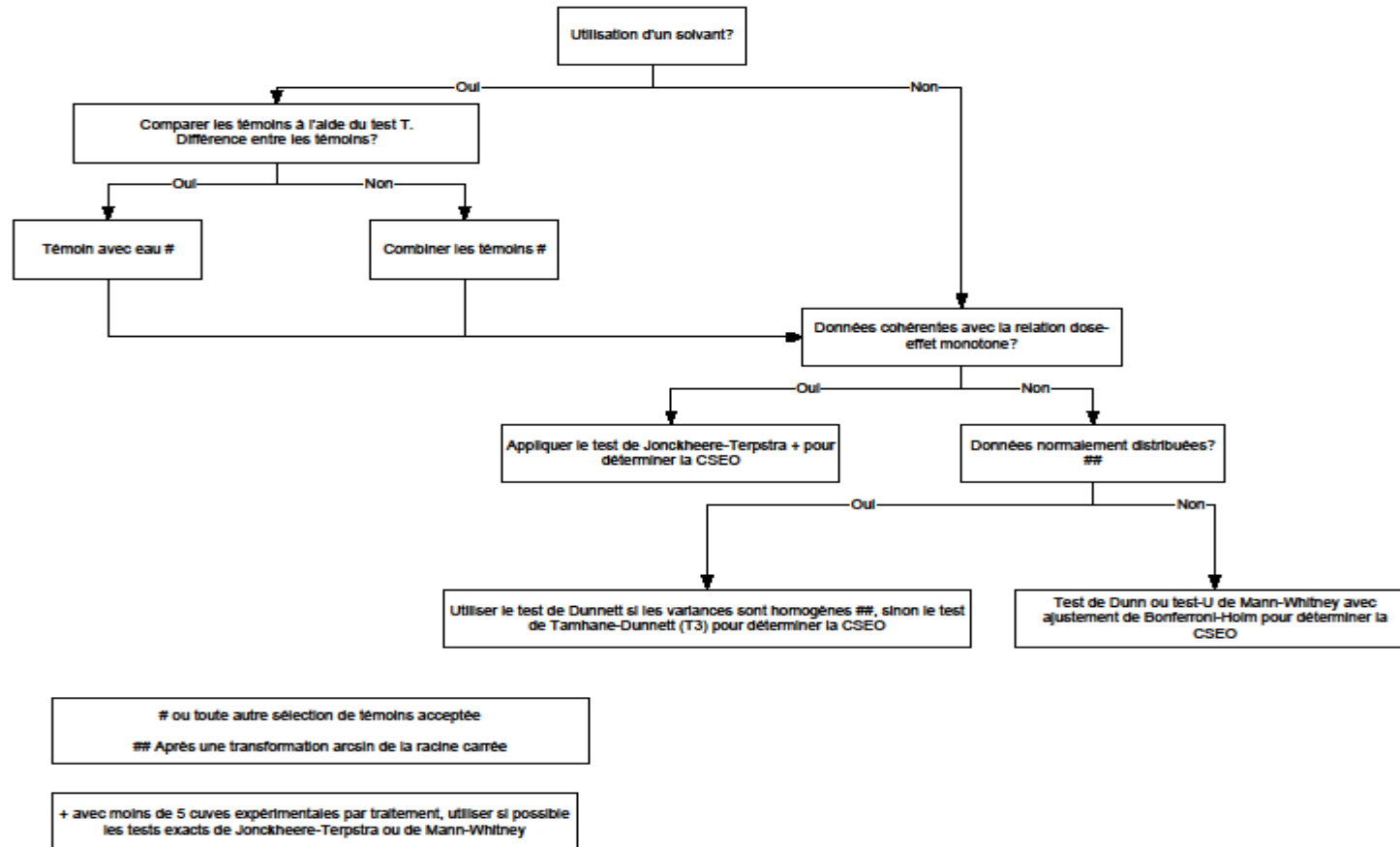


Diagramme de décision statistique pour l'analyse de ratio mâles/femelles



ANNEXE 9

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

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

Préparation des tampons :

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

2. Tampon 2 utilisé pour la réaction PCR :
 - a. 20 g de Chelex (Biorad, Munich, GE, par exemple)
 - b. Gonfler dans 100 ml d'eau distillée→ autoclaver

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

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

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

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

Tampon 10x pour PCR avec MgCl₂ : 670 mM de Tris/HCl (pH 8.8 à 25°C), 160 mM de (NH₄)₂SO₄, 25 mM de MgCl₂, 0.1 % de Tween 20/acide laurique

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

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

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

3. Programme de PCR pour actines :

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

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

4. Programme de PCR pour gènes X et Y :

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

- Amorce spécifique :
 - “PG 17.5” (upper/forward) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG
 - “PG 17.6” (lower/reverse) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA_o 17,6”
- Programme :
 - 5 min à 95 °C
 - Cycle (40 fois) :
 - Dénaturation → 45 sec à 95 °C
 - Hybridation → 45 sec à 55 °C
 - Élongation → 1 min 30 sec à 68 °C
 - 15 min à 68 °C

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

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

- Amorce spécifique :
 - “DMTYa (upper/forward)” → GGC CGG GTC CCC GGG TG
 - “DMTYd (lower/reverse)” → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

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

ANNEXE 10

GUIDE DE PRÉLÈVEMENT TISSULAIRE POUR LA DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE ET POUR LA DÉTERMINATION DU SEXE GÉNÉTIQUE PAR RÉACTION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRASE (PCR) CHEZ L'ÉPINOCHÉ***Prélèvement tissulaire et extraction de l'ADN***

L'ADN peut être extrait au moyen d'une variété de réactifs disponibles dans le commerce, et en utilisant des procédés d'extraction manuelle ou automatique. Le protocole utilisé au laboratoire CEFAS de Weymouth est décrit ci-dessous, et des méthodes alternatives ont été ajoutées dans certains cas.

1. Au moyen de ciseaux fins, un petit morceau tissulaire (10-20 mg) de la partie dorso-latérale (après prélèvement de la tête et de la queue pour la mesure de la vitellogénine) est prélevé de chaque poisson individuellement. Le tissu est placé dans un tube et soit directement placé dans l'azote liquide (conservation à -80°C) soit rempli par de l'éthanol à 70% (pour un transport et une conservation à 4°C). Les ciseaux sont nettoyés après chaque dissection de poisson individuellement dans de l'éthanol à 70%, puis trempés dans de l'eau distillée avant d'être séchés sur du papier absorbant.

2. L'éthanol (en cas de présence) est ôté par aspiration et le tissu est digéré du jour au lendemain avec de la protéinase K dans 400 µl de tampon ATL (Qiagen). Un aliquot (200 µl) du produit de cette digestion est transféré dans un S-Block (Qiagen) de 96 puits, et l'ADN extrait dans un format de 96 puits utilisant le BioRobot Universel Qiagen et le kit Qlamp Investigator BioRobot. L'ADN est élué dans 50 µl d'une eau libre de DNase et de RNase. Dans le cas où il est fait usage de prélèvements tissulaires durs pour extraire l'ADN (tel que le rachis ou la nageoire pectorale) il peut s'avérer nécessaire d'homogénéiser l'échantillon dans le tampon de lyse au moyen d'un lyseur de tissu FastPrep® ou un système équivalent de rupture des tissus.

Alternativement,

- a. L'échantillon tissulaire est digéré du jour au lendemain avec la protéinase K dans 400 µl de tampon de lyse G2 (Qiagen) et l'ADN est extrait de 200 µl du produit de digestion en utilisant soit le kit *EZ-1 DNA easy tissue* et le Biorobot EZ-1, ou alors le kit *DNA mini easy tissue*.
- b. Les prélèvements tissulaires sont soumis au réactif DNazol. Les prélèvements sont rapidement lysés dans 1 ml de DNazol pendant 10 min dans un tube de 1.5 ml à l'intérieur d'une centrifugeuse, suivi d'une centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min afin d'enlever toutes les particules. L'échantillon lysé est ensuite transféré dans un nouveau tube de centrifugation de 1.5 ml contenant 500 µl d'éthanol à 100% , puis centrifugé à 13000rpm pendant 10 min pour précipiter l'ADN. L'éthanol est enlevé et remplacé par 400 µl d'éthanol à 70%, puis centrifugé à 13000 rpm pendant 5 min et le culot d'ADN est dissous dans 50 µl d'eau libre d'ADNase et de RNase. A nouveau, dans le cas où il est fait usage de prélèvements tissulaires durs pour extraire l'ADN (tel que le rachis ou la nageoire pectorale) il peut s'avérer nécessaire d'homogénéiser l'échantillon dans le tampon de lyse au moyen d'un lyseur de tissu FastPrep® ou un système équivalent de rupture des tissus, préalablement à l'extraction d'ADN.

1. L'ADN est stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

Note importante : des gants sont portés lors des manipulations.

Analyse par réaction en chaîne de la polymérase (PCR)

Les amplifications ont été réalisées au moyen de 2.5 µl d'extrait d'ADN dans un volume réactionnel de 50 µl, et en utilisant le *ldh* locus primers (comme décrit par Peichel et al, 2004. *Current biology* 1 :1416-1424) :

- Amorce sens : 5'GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'
- Amorce antisens : 5'TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

Il existe un grand nombre de fournisseurs de réactifs appropriés pour l'analyse PCR. La méthode décrite ci-dessous est celle actuellement utilisée au laboratoire CEFAS de Weymouth.

1. Préparation du « mélange réactionnel » (50 µl par échantillon) :

- Un mastermix est préparé comme suit. Celui-ci peut être préparé à l'avance et conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Préparer une quantité de mastermix suffisante pour un contrôle négatif (eau de qualité biologie moléculaire uniquement):

	Volume	Concentration finale
(concentration du stock) /échantillon		
5x GoTaq® Tampon de réaction, 10 µl		1x
MgCl ₂ 5 µl (25 nM)		2.5nM
Nucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0.5 µl (25 mM each)	250 µM each
Amorce sens	0.5 µl (0.1nmol/µl)	20 µM
Amorce anti-sens	0.5 µl (0.1nmol/µl)	20 µM
Eau (qualité biologie moléculaire)	37.75 µl	
GoTaq Polymérase	0.25 µl	1.25 U

- Déverser 47.5 µl dans un tube à paroi fine de PCR étiqueté de 0.5 ml ;
- Ajouter 2.5 µl d'ADN purifié dans le tube étiqueté approprié. Répéter l'opération pour tous les échantillons et le contrôle négatif ;
- Ajouter par-dessus 2 gouttes d'huile minérale. Alternativement, utiliser un cycleur thermal à couvercle chauffant ;
- Fermer les couvercles ;
- Les échantillons ont été dénaturés dans un cycleur thermal Peltier PTC-225 à 94 +/- 2 °C pendant 5 minutes, suivi de 39 cycles de 94 +/- 2 °C pendant 1 minute, 55 +/- 2°C pendant 1 minute, 72 +/- 2 °C pendant 1 minute, et une extension finale à 72 +/- 2 °C pendant 10 minutes.

2. Préparation du gel d'agarose (2%) :

Traditionnellement les produits de la PCR sont résolus sur gel d'agarose à 20% contenant du bromure d'éthidium. Des systèmes d'électrophorèse capillaires peuvent également être utilisés.

- Peser 2g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE 1x ;
- Chauffer dans un four à micro-onde (environ 2-3 minutes) pour dissoudre l'agarose ;
- Ajouter 2 gouttes de bromure d'éthidium pour atteindre la concentration finale de 0.5 µg/ml ;
- Transférer la solution encore chaude dans l'équipement de prise du gel ;
- Attendre que le gel durcisse.

3. Electrophorèse sur gel :

- Transférer le gel d'agarose dans l'appareil d'électrophorèse et immerger dans le tampon de TAE 1x ;
- Charger 20 µl de chaque échantillon dans un puits séparé, en ajoutant un marqueur de poids moléculaire (échelle d'ADN de 100pb, Promega) dans un puits à part ;
- Effectuer l'électrophorèse à 120 V pendant 30-45 minutes.

4. Visualisation des produits d'amplification

Si le bromure d'éthidium a été incorporé dans le gel d'agarose comme décrit ci-dessus, les produits d'ADN sont visualisés sous une source d'UV. Alternativement, le gel d'agarose est coloré en couvrant le gel par une solution diluée de bromure d'éthidium (0.5µg/ml dans de l'eau) pendant 30 minutes avant de pouvoir visualiser.

ANNEXE 11**GUIDE POUR LA PROCÉDURE DE FERTILISATION ARTIFICIELLE CHEZ L'ÉPINOCHÉ**

Le but de cette section est de décrire la procédure pour obtenir des œufs d'épinoche fertilisés pour leur utilisation dans l'essai de développement sexuel.

Procédures***Recueil de sperme chez les mâles***

1. Un mâle bien coloré de la population est euthanasié.
2. Les testicules sont disséqués de chaque côté du poisson. Les testicules sont généralement très pigmentés, de forme allongée facilement visibles depuis la ligne médiane latérale du corps. Utiliser l'une des méthodes suivantes :
 - a. Utiliser une paire de ciseaux fins, commencer à ouvrir depuis le cloaque et faire une incision de 1- 1.5 cm avec une petite entaille à 45°.
 - b. Utiliser le scalpel pour faire une petite incision sur le côté du poisson légèrement postérieure au pelvis et ventralement par rapport aux plaques latérales.
3. Les testicules sont enlevées au moyen de forceps fins et placés dans une boîte de pétri.
4. Chaque testicule est recouvert de 100 µl de solution de Hank fraîchement préparée.*
5. Les testicules sont finement coupés en dés au moyen d'un scalpel ou d'une lame de rasoir. Ceci permet la libération de sperme et donne à la solution de Hank un aspect laiteux.
6. Le fluide contenant le sperme est placé dans un tube ; il faut veiller à ne pas introduire de tissu testiculaire lors du pipetage.
7. 800 µl de solution de Hank sont ajoutés dans le tube et bien mélangés.
8. Si nécessaire, le mâle peut être préservé par fixation dans de l'éthanol à 100% ou un autre produit de fixation. Cela est particulièrement important si l'étude vise à assigner une origine parentale à la descendance.

*Solution salée tamponnée de Hank (HBSS):

HBSS est nécessaire pour préserver le sperme dans le cadre d'une fertilisation. Note importante : Bien que la totalité de la solution-mère requise puisse être préparée à l'avance, le stock N° 5 et consécutivement la solution finale sont fraîchement préparés le jour même.

Stock N° 1

NaCl	8.00g
KCl	0.40g
Eau distillée	100 ml

Stock N° 2

Na ₂ HPO ₄ (anhydre)	0.358g
KH ₂ PO ₄	0.60g
Eau distillée	100 ml

Stock N° 3

CaCl ₂	0.72g
Eau distillée	50 ml

Stock N° 4

MgSO ₄ , 7H ₂ O	1.23g
Eau distillée	50 ml

Stock N° 5

NaHCO ₃	0.35g
Eau distillée	10 ml

Note : Si vous avez déjà certains de ces sels mais avec un contenu aqueux différent (p.e. 2 H₂O au lieu de la forme anhydre), vous pouvez faire usage de ceux-ci mais il faut au préalable ajuster le poids en fonction du poids moléculaire.

Pour la solution finale de Hank, combiner les stocks de la façon suivante :

1. Stock 1	1.0 ml
2. Stock 2	0.1 ml
3. Stock 3	0.1 ml
4. Eau distillée	8.6 ml
5. Stock 4	0.1 ml
6. Stock 5	0.1 ml

Bien mélanger avant utilisation.

Fertilisation

1. Les femelles gravides, grosses, sont identifiées dans la population choisie ; les femelles sont prêtes à être pressées seulement quand les œufs sont visiblement protubérant à partir du cloaque. Les femelles prêtes prennent une posture caractéristique avec la tête haute.
2. Passer doucement un doigt le long du poisson vers la queue pour faciliter l'expulsion d'un paquet d'œufs dans une boîte de Pétri propre. Répéter l'opération de l'autre côté et replacer le poisson dans l'aquarium.
3. Les œufs peuvent être étalés en couche à l'aide d'un pinceau fin. Il est important d'essayer d'exposer un grand nombre d'œufs au sperme, et donc il faut maximiser la surface de l'œuf en contact avec le sperme. Note importante : Garder les œufs humides en posant un tissu imbibé sur eux (il est important que les œufs ne soient pas au contact direct de l'eau car ceci pourrait durcir le chorion prématurément et ainsi empêcher la fertilisation). Il y a des variations importantes du nombre d'œufs qu'une femelle peut produire, mais en moyenne, environ 150 œufs peuvent être obtenus à partir d'une seule femelle gravide.

4. 25 µl de sperme dans le mélange de Hank sont répandus de manière uniforme sur la totalité des œufs à l'aide du pinceau. Les œufs vont rapidement durcir et changer de couleur (en l'espace d'une minute) une fois que la fertilisation a commencé. Si le nombre estimé d'œufs est supérieur à 150, répéter la procédure. Aussi, si les œufs ne durcissent pas après une minute, ajouter un peu plus de sperme. Note importante : *l'ajout de sperme n'améliore pas forcément le taux de fertilisation.*
5. Les œufs et la solution spermatique sont laissés en contact pour « interagir » pendant au moins 15 minutes et les œufs fertilisés peuvent être placés dans l'aquarium ou à lieu l'exposition à la substance chimique d'essai dans les 90 minutes qui suivent la fertilisation.
6. La procédure est répétée avec une autre femelle jusqu'à ce que le nombre d'œufs collectés soit suffisant.
7. Préserver quelques œufs du dernier lot et fixer ces œufs dans de l'acide acétique à 10%.

Dénombrement et répartition des œufs dans les aquariums d'essai

1. Les œufs sont répartis également entre chaque groupe de traitement pour éviter tout biais génétique. Chaque lot d'œufs fertilisés est séparé en groupes de taille égale (autant que de groupes de traitement) en utilisant un instrument pointu (*i.e.* un forceps d'entomologie à large lame ou une boucle d'inoculation). Pour 4 réplicats par traitement, contenant chacun 20 œufs, 80 œufs sont répartis par aquarium d'exposition. Note importante : *il est conseillé d'ajouter 20% d'œufs en plus (i.e. 96 œufs par groupe de traitement) jusqu'à ce que l'on soit sûr d'obtenir des pourcentages de fertilisation de 100%.*
2. Les œufs d'épinoche sont enclins aux infections fongiques en dehors du nid gardé par le père. A cet égard, le traitement de tous les œufs avec du bleu de méthylène pendant les 5 premiers jours de l'essai est extrêmement important. Une solution mère de bleu de méthylène à 1mg/ml est ajoutée aux aquariums d'exposition pour donner une concentration finale maximum de 2,125 mg/l. Note importante : *les épinoches ne sont pas exposées au bleu de méthylène après éclosion et le système est sans méthylène à partir du 6^{ème} jour.*
3. Les œufs sont inspectés chaque jour et tout œuf mort ou non fertilisé est enregistré come tel. Important note : *Les œufs ne sont jamais hors de l'eau jusqu'à l'éclosion, même pendant un temps très court.*