



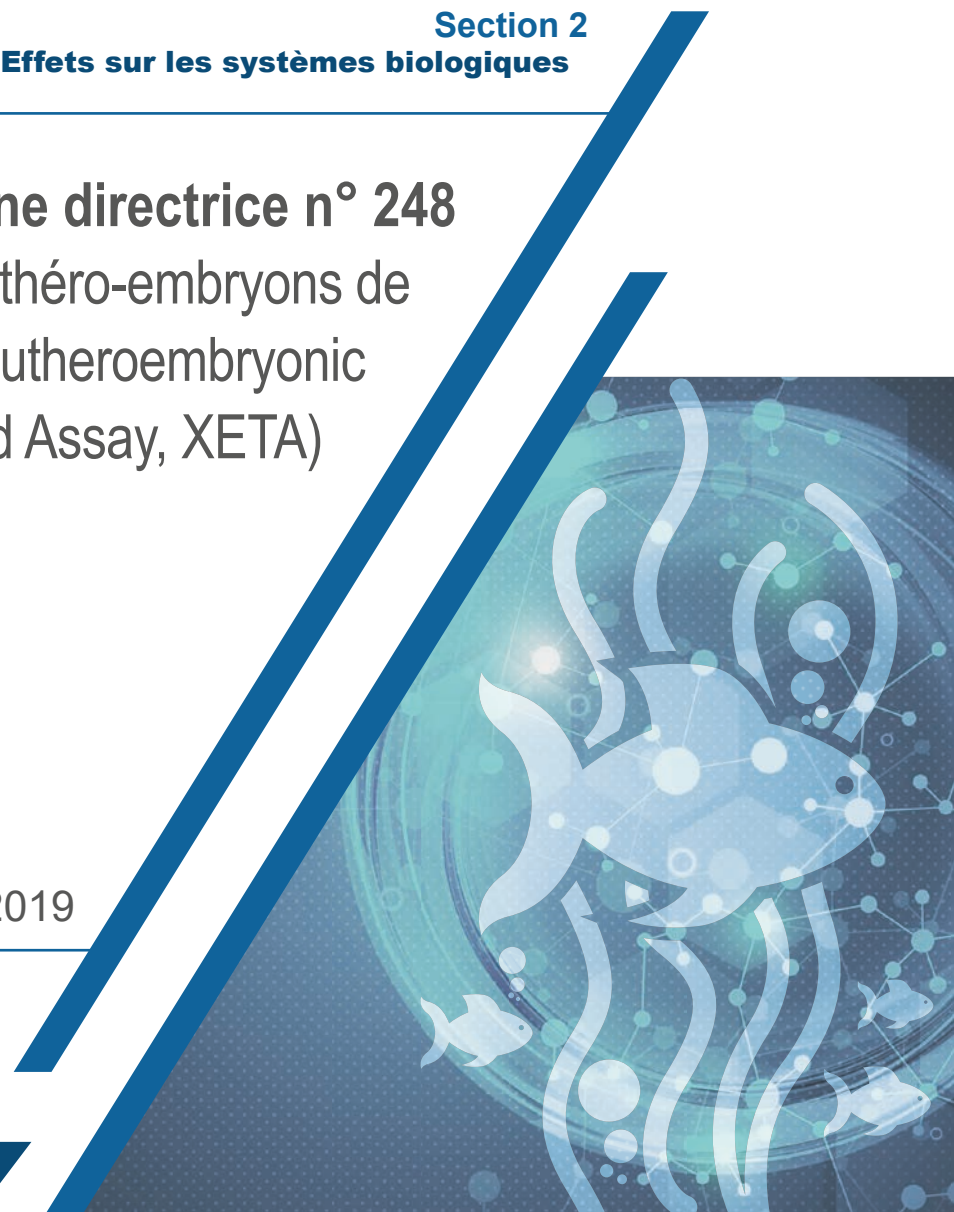
Section 2
Effets sur les systèmes biologiques

Ligne directrice n° 248

Essai thyroïdien sur éleuthéro-embryons de
xénope (*Xenopus* Eleutheroembryonic
Thyroid Assay, XETA)

18 juin 2019

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



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

Essai Thyroïdien Sur Éleuthéro-Embryons De Xénope (XETA)

INTRODUCTION

1. La Ligne directrice Essai thyroïdien sur éleuthéro-embryons de xénope (*Xenopus* Eleutheroembryonic Thyroid Assay, XETA) décrit un test aquatique utilisant des éleuthéro-embryons de *Xenopus laevis* (*X. laevis*) transgénique au stade 45, selon Nieuwkoop et Faber (Nieuwkoop et Faber, 1994), dans un format multi-puits, afin de détecter les produits chimiques agissant sur la thyroïde. Le XETA a été conçu comme un test de dépistage assurant un débit moyen pour des essais à court terme visant à mesurer la réponse d'éleuthéro-embryons à des produits chimiques potentiellement actifs sur la thyroïde (Fini et al., 2007). Destiné au dépistage sur des amphibiens, le XETA permet de classer les produits chimiques en produits potentiellement actifs ou inactifs sur la thyroïde, mais n'est pas conçu pour l'établissement de niveaux de toxicité en vue de l'évaluation des risques (CSEO ou CEx, par exemple). Le XETA est placé au niveau 3 du cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (OCDE, 2018a). La LD 150 de l'OCDE fournit des indications complémentaires pour l'interprétation et l'extrapolation entre taxons des résultats du XETA (OCDE, 2018a).

2. L'espèce sélectionnée pour le XETA est le dactylèthre d'Afrique du Sud, *X. laevis*. *X. laevis* est un modèle amphibien approprié, car les premiers stades de son développement et sa métamorphose dépendante des hormones thyroïdiennes (HT ; voir les abréviations à l'Annexe 1) ont fait l'objet de nombreuses études. De plus, les amphibiens et les vertébrés supérieurs, mammifères compris, ont en commun une grande homologie génétique (Hellsten et al., 2010), ainsi que des systèmes de biotransformation similaires et des processus endocriniens homologues (Fini et al., 2012), si bien que l'essai XETA fournit des informations extrapolables à d'autres taxons. Cette espèce a été utilisée dans les deux Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques portant sur des amphibiens : l'AMA (Essai de métamorphose des amphibiens ; LD 231 de l'OCDE) (OCDE, 2009) et le LAGDA (Essai de croissance et de développement des larves d'amphibiens ; LD 241 de l'OCDE) (OCDE, 2015).

3. L'essai est basé sur la transcription et utilise une lignée de *X. laevis* transgénique, porteuse de la construction génétique TH/bZIP-GFP. Dans cette construction génétique, le promoteur du gène TH/bZIP est couplé à un gène rapporteur pour la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein, GFP). Le gène TH/bZIP code un facteur de transcription associé à la métamorphose des amphibiens, un processus contrôlé par les HT. L'expression du gène TH/bZIP est régulée directement par les HT au moment de la métamorphose (Furrow et Brown, 1999). L'expression de TH/bZIP est un déclencheur de la métamorphose et en contrôle pour une part le déroulement dans le temps. L'utilisation de ce gène comme marqueur biologique permet la détection d'éventuelles modulations de l'activité de la thyroïde induites par le produit chimique testé. Avant de pratiquer le XETA, le laboratoire vérifiera qu'il dispose des certifications qui peuvent être exigées par la réglementation locale sur l'utilisation d'organismes transgéniques.). Le XETA doit être pratiqué sur la lignée transgénique TH/bZIP-GFP utilisée pour la mise au point de la Ligne directrice, qui est disponible dans le commerce (OCDE, à paraître). L'utilisation d'une autre lignée transgénique basée sur le promoteur du gène TH/bZIP induisant l'expression de la GFP ou d'un autre gène rapporteur suppose une validation complète par l'OCDE afin d'adapter les critères de validation, l'analyse statistique et les seuils de fluorescence utilisés dans le diagramme de décision. Par conséquent, d'autres lignées transgéniques ne peuvent être envisagées comme options.

4. Ce projet de Ligne directrice est fondé sur deux études de validation internationales interlaboratoires conduites entre 2012 et 2017 (OCDE, à paraître). Le test a été validé dans six laboratoires, sur neuf substances d'essai monoconstituant lors de l'examen des deux phases successives de validation.

5. L'effet mesuré est l'induction de fluorescence chez des éléuthéro-embryons. Lorsque la transcription de la construction génétique est activée ou inhibée suite à l'exposition à un produit chimique, les éléuthéro-embryons expriment plus ou moins de GFP et émettent donc plus ou moins de fluorescence, comparés aux individus non exposés chez lesquels la fluorescence reste à son niveau de base.

6. Le produit chimique est testé en présence et en l'absence de 3.25 µg/L de l'HT triiodothyronine (T3). La concentration d'HT restant très basse, à ce stade larvaire, l'addition de T3 au milieu d'essai permet la détection des produits chimiques affectant la disponibilité de l'hormone T3 ou antagonistes du récepteur de l'hormone thyroïdienne (RT). Le changement induit dans l'expression du gène par la combinaison de T3 et du produit chimique testé est donc un phénomène obtenu au laboratoire, qui n'est pas observé, en l'absence de T3 exogène, à ce stade du développement, et qui n'est donc pas présent chez les individus et populations d'amphibiens à l'état naturel.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

7. L'essai mesure la capacité d'un produit chimique à activer ou inhiber la transcription de la construction génétique, soit directement par l'établissement d'une liaison avec le récepteur de l'hormone thyroïdienne (RT) ou la modification de la liaison entre HT et RT, soit indirectement en modifiant la quantité d'HT disponible pour activer le RT et donc la transcription de la construction TH/bZIP-GFP. Le XETA détecte les effets du produit chimique dans les tissus sensibles à l'hormone thyroïdienne (c'est-à-dire les tissus contenant des récepteurs de l'hormone thyroïdienne), et pas seulement les effets sur l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien. Il est aujourd'hui établi que le XETA détecte les produits chimiques agissant par différents mécanismes d'action, incluant des agonistes des RT (exemples : thyroxine [T4], acide 3,5,3'-triiodothyroacétique [TRIAC]), des

antagonistes pharmacologiques des RT (tels que NH₃ ; CAS 447415-26-1), des modulateurs de la clairance des HT tels que les modulateurs de l'UDP-glucuronosyltransférase (phénobarbital, par exemple) et des modulateurs du métabolisme des HT, tels que les inhibiteurs de la déiodinase (acide iopanoïque, par exemple) (Fini et al., 2007 et OCDE, à paraître). Le XETA détecte en outre potentiellement les modulateurs du transport d'HT via une interaction avec les protéines de liaison des HT au plasma et les inhibiteurs des transporteurs transmembranaires des HT. Les éléuthéro-embryons de *X. laevis* ne synthétisant pas leurs propres HT au stade NF 45, le XETA n'a pas pour objet la détection des inhibiteurs de la synthèse des HT. Le XETA ne permet pas de distinguer les différents modes d'action, mais indique si un produit chimique agit globalement comme un activateur ou un inhibiteur des voies de signalisation thyroïdiennes chez l'éléuthéro-embryon de *X. laevis*. La transcription de la construction TH/bZIP-GFP exigeant l'action directe de RT sur le promoteur TH/bZIP, le XETA n'est pas conçu pour détecter les produits chimiques affectant la signalisation induite par les HT lorsque celle-ci passe par des voies de signalisation alternatives ne conduisant pas à une altération de l'interaction entre les RT et l'ADN (« actions non génomiques »).

8. La présente Ligne directrice repose sur la quantification de la fluorescence de tout l'éléuthéro-embryon. Une limite de cette Ligne directrice est qu'elle ne doit pas être utilisée pour tester des produits chimiques qui émettent une fluorescence entre 500 et 550 nm lorsqu'ils sont excités à des longueurs d'onde comprises entre 450 et 500 nm, et qui sont susceptibles de s'accumuler dans l'éléuthéro-embryon. Les produits chimiques présentant ces deux propriétés peuvent induire une fluorescence qui risque d'être interprétée comme un signal GFP, conduisant à identifier à tort le produit chimique testé comme un produit agissant sur la thyroïde. Un protocole simple permettant de déterminer si le produit chimique testé émet une fluorescence est proposé au paragraphe 25. Ce protocole requiert l'usage d'éléuthéro-embryons de type sauvage.

9. Lorsque l'on envisage de tester des mélanges, des produits chimiques difficiles à tester (p. ex., instables) ou des produits chimiques d'essai qui ne relèvent pas clairement du domaine d'applicabilité décrit dans la présente ligne directrice, il convient de tenir compte de la question de savoir si les résultats de ces résultats qui sont significatifs scientifiquement. Si la Ligne Directrice est utilisée pour tester un mélange, un UVCB (substance de composition inconnue ou variable, produit de réaction complexe ou matériel biologique) ou une substance multiconstituants, sa composition devra être caractérisée, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique de ses constituants, leur présence et quantité, ainsi que leurs propriétés spécifiques. On trouvera des recommandations pour l'essai des produits chimiques difficiles à tester (tels que les mélanges, UVCB ou substances multiconstituants) dans le document d'orientation de l'OCDE N° 23 (OCDE, 2019). La méthode d'essai décrite dans la présente Ligne directrice n'est pas adaptée à l'essai des produits chimiques volatils.

PRINCIPE DE L'ESSAI

Schéma expérimental général

10. Le schéma expérimental général consiste à exposer des éléuthéro-embryons de *X. laevis* transgénique TH/bZIP-GFP au stade NF45 dans des plaques de 6 puits à un produit chimique à tester en présence (mode « dopé ») et en l'absence (mode « non dopé ») d'un co-traitement par 3.25 µg/L de T3. Il est recommandé d'utiliser un minimum de trois concentrations et des témoins. Le test utilise 20 éléuthéro-embryons répartis dans deux puits (10 organismes par puits) par niveau de traitement (niveau de concentration et

témoins), en régime semi-statiques. Pour trois concentrations d'essai plus les témoins, et trois épreuves, le XETA utilise 540 éléuthéro-embryons (voir la graphique 1). La durée d'exposition est de 72 h avec un renouvellement quotidien (à 24 h et 48 h) des solutions d'exposition. Trois épreuves indépendantes devraient être réalisées pour chaque essai. L'essai mesure la fluorescence GFP dans les éléuthéro-embryons transgéniques TH/bZIP-GFP au moyen d'un spectrofluorimètre ou d'un système d'imagerie par fluorescence transformant le signal de fluorescence en donnée numérique. On trouvera à l'Annexe 2 une présentation détaillée des conditions d'essai.

Témoins

11. Le XETA requiert les groupes témoins suivants :
 - Témoin milieu d'essai : 2 puits avec 10 organismes/puits sont exposés au milieu d'essai seul. Ce témoin définit le niveau de fluorescence de base dans le milieu d'essai.
 - Témoin T3 : Ce témoin établit le niveau de fluorescence pour une concentration de T3 de 3.25 µg/l. Cette concentration correspond à la concentration plasmatique d'hormone T3 lors de la métamorphose de *X. laevis* et est connue pour induire des changements morphologiques et une modulation des gènes cibles des HT chez les têtards prémétamorphiques (Leloup et Buscaglia, 1977 et Shi, 2000). Ce témoin sert de témoin positif pour les groupes sans co-traitement T3 et de témoin de référence pour le groupe recevant un co-traitement T3.
 - Témoin T4 (témoin de saturation) : Ce témoin établit le niveau de fluorescence maximal qui peut être quantifié au cours de l'expérience. Ce témoin sert de témoin positif pour les groupes avec co-traitement T3 et définit, avec le témoin milieu d'essai, la plage dynamique de fluorescence pour une expérience.
12. Si un solvant est utilisé, le témoin milieu d'essai, le témoin T3 et le témoin T4 doivent recevoir une concentration égale de solvant (voir aussi § 32).

Réplication

13. Un essai comprend trois épreuves valides et indépendantes utilisant 2 x 10 organismes/groupe traitement (voir la graphique 1). Pour chaque épreuve, on utilisera des solutions indépendantes et des organismes issus d'une ponte indépendante (voir le paragraphe 37). Les épreuves sont conduites de préférence séquentiellement, mais peuvent aussi être conduites en parallèle. Les données brutes pour un produit chimique testé sont obtenues en réunissant les données des trois épreuves, soit un total de n=60 valeurs de fluorescence pour chaque groupe traitement.

Graphique 1. Aperçu du XETA. (« +/- T3 » correspond aux groupes dopés/non dopés).

Trois indépendantes valides : pontes différentes, solutions différentes	épreuves	• Témoin milieu d'essai • Témoin T3 • Témoin T4 • Produit chimique testé : 3 concentrations +/- T3 • 20 têtards/groupe	• Témoin milieu d'essai • Témoin T3 • Témoin T4 • Produit chimique testé : 3 concentrations +/- T3 • 20 têtards/groupe	• Témoin milieu d'essai • Témoin T3 • Témoin T4 • Produit chimique testé : 3 concentrations +/- T3 • 20 têtards/groupe

Réunir les 20 valeurs de fluorescence/groupe pour obtenir 60 valeurs/groupe

Données brutes du XETA	• Témoin milieu d'essai • Témoin T3 • Témoin T4 • Produit chimique testé : 3 concentrations +/- T3 • 60 têtards/groupe
------------------------	--

- Vérifier la conformité aux critères de validité
- Procéder à l'analyse statistique

Note : Un essai XETA est composé de trois épreuves indépendantes et utilise 540 éléuthéro-embryons au total. Un témoin solvant et un témoin solvant T3 doivent être réalisés lors de chaque épreuve en plus du témoin milieu d'essai et du témoin T3, si le solvant n'a pas fait l'objet auparavant d'un test XETA donnant un résultat négatif (requiert 120 éléuthéro-embryons supplémentaires).

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE TESTÉ

14. Les informations disponibles sur le produit chimique testé devront grapher dans le rapport (voir paragraphe 53) ; elles incluent notamment la formule structurale, le degré de pureté et, selon les données disponibles, la stabilité à la lumière, la stabilité dans les conditions de l'essai, le pKa, le Po_e, des informations sur le devenir du produit et son potentiel de dégradation rapide dans le système d'essai (résultats d'un test de biodégradabilité, par exemple, voir la LD 301 de l'OCDE (OCDE, 1992) et la LD 310 de l'OCDE (OCDE, 2014a)).

15. La solubilité dans l'eau du produit chimique testé doit être connue et il importe de disposer d'une méthode analytique validée, dont l'exactitude, la précision et la sensibilité sont connues, pour le dosage du produit dans les solutions d'essai, avec indication du rendement de récupération et de la limite de quantification. Pour plus d'informations sur la validation des méthodes d'analyse quantitatives, on se reportera à la LD 204 (OCDE, 2014b). La détermination analytique de la concentration de produit chimique testé sera réalisée avant et après le renouvellement du milieu d'essai (voir paragraphe 35).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

Quantification de la fluorescence

16. Le XETA repose sur la quantification de la fluorescence émise par chaque organisme. Pour garantir une quantification correcte et précise, il convient de procéder à des tests préalables. Ces tests ont pour objet d'étalonner le spectrofluorimètre et de s'assurer qu'il permet la lecture d'une plage dynamique de mesures de fluorescence adaptée. Ces tests sont décrits à l'Annexe 3. Une autre solution consiste à quantifier par imagerie la fluorescence émise par les éléuthéro-embryons, au moyen d'un microscope à

fluorescence équipé d'une caméra appropriée (OCDE, à paraître). Dans ce cas, l'amplitude de l'induction de fluorescence obtenue avec une gamme de concentrations de T3 doit remplir les mêmes critères que pour le spectrofluorimètre ; une optimisation des paramètres d'acquisition et d'analyse de l'image est vivement recommandée, en suivant la même procédure que celle qui est indiquée pour les spectrofluorimètres à l'Annexe 3. L'utilisation d'un microscope à fluorescence équipé d'une caméra appropriée est la méthode à privilégier, car elle offre la possibilité d'une étape de contrôle de qualité des images permettant d'identifier les éléuthéro-embryons mal placés ou un signal de fluorescence sans lien avec l'activation de la thyroïde (poussière ou fibres fluorescentes, produit chimique testé fluorescent accumulé dans l'éléuthéro-embryon, schéma de fluorescence anormal).

Produits chimiques d'épreuve de compétence

17. Avant d'utiliser en routine la méthode décrite dans la présente Ligne directrice, les laboratoires devront faire la preuve de leurs compétences techniques en classant correctement les quatre produits chimiques d'épreuve de compétence du tableau 1.

Tableau 1. Substances d'épreuve de compétence. T4 (thyroxine), PTU (propylthiouracile).

Produits chimiques	N° CAS	Catégorie	Concentrations à tester	Effet significatif attendu
T4	51-48-9	Active	0.001 ; 0.01 ; 0.1 ; 1 et 10 mg/L	0.01 à 0.1 mg/L
PTU	51-52-5	Active	1 ; 3 ; 10 ; 30 ; 100 mg/L	3 à 100 mg/L
Abamectine	67-64-1	Inerte	0.1 ; 0.5 ; 1 ; 5 et 10 mg/L	Inerte
Méthomyl	16752-77-5	Inerte	18 ; 36 ; 56 ; 112 ; 168 µg/L	Inerte

Note : Les effets significatifs attendus ont été établies lors de la validation du XETA par l'OCDE (OCDE, à paraître).

CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

18. Pour que l'essai soit valide, les critères suivants doivent être remplis pour chacune des trois épreuves et pour les trois épreuves réunies :

- Une induction de fluorescence statistiquement significative doit être mesurée entre le groupe témoin milieu d'essai et le groupe témoin T3. La fluorescence moyenne du groupe T3 doit être d'au moins 20 % supérieure à la fluorescence moyenne du groupe témoin milieu d'essai.
- Il doit y avoir une induction de fluorescence statistiquement significative d'au moins 70 % entre le groupe témoin T4 et le témoin milieu d'essai.
- Le coefficient de variation de l'intensité de fluorescence mesurée pour le témoin milieu d'essai ne doit pas excéder 30 %.
- Le pH initial des solutions d'exposition doit être compris entre 6.5 et 8.5 pour chaque renouvellement.

- La mortalité ne doit pas excéder 10 % dans chaque groupe témoin.
- Le pourcentage d'organismes malformés ne doit pas excéder 10 % dans chaque groupe témoin.

Ces critères de validité sont applicables après troncation ou contrôle de qualité de l'image, si une troncation ou un contrôle de qualité de l'image est pratiqué (voir le paragraphe 45). Si un écart mineur est observé par rapport aux critères de validité, les conséquences doivent être examinées en relation avec la fiabilité des données de l'essai, et ces considérations doivent être notées dans le rapport d'essai.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

19. On utilise du matériel courant de laboratoire et en particulier :
 - incubateur de laboratoire au tout autre dispositif adéquat de régulation de la température et de la lumière ;
 - plaques transparentes de 6 puits pour cultures cellulaires constituées d'un matériau chimiquement inerte ;
 - plaques noires de 96 puits à fond conique certifiées pour la quantification de la fluorescence ;
 - pH-mètre ;
 - stéréomicroscope équipé d'une source lumineuse (pour le tri des embryons et éléuthéro-embryons) ;
 - spectrofluorimètre (lecteur de plaques de 96 puits) ou microscope à fluorescence équipé pour la quantification de la fluorescence GFP (OCDE, à paraître) ;
 - instruments d'analyse adaptés au produit chimique testé, ou recours à des services d'analyse extérieurs.

Organisme d'essai

20. Les organismes soumis à l'essai pour le XETA sont des éléuthéro-embryons hétérozygotes de *X. laevis*, de la lignée transgénique TH/bZIP-GFP. Ces organismes doivent être produits en accouplant un *X. laevis* TH/bZIP-GFP homozygote avec un *X. laevis* de type sauvage. Plusieurs laboratoires assurent la production de la lignée transgénique TH/bZIP-GFP (OCDE, à paraître), qui peut être obtenue par souscription à un accord de licence. Lorsqu'un produit chimique testé se révèle fluorescent, des éléuthéro-embryons de *X. laevis* de type sauvage peuvent également être nécessaires, afin de vérifier s'il peut y avoir une bio-accumulation du produit se traduisant par un signal fluorescent chez l'éléuthéro-embryon (voir le paragraphe 25).

21. Lors de chaque épreuve, tous les organismes utilisés comme organismes d'essai doivent provenir de la même ponte. Chaque oeuf doit être issu d'une reproduction entre un seul mâle et une seule femelle. La phase d'exposition de l'essai débute lorsque les éléuthéro-embryons sont au stade NF45 (7 jours après fertilisation à 21 °C, Annexe 4). Les éléuthéro-embryons doivent être issus de préférence d'animaux reproducteurs appartenant au laboratoire. Il est toutefois possible de les faire venir d'un autre laboratoire en faisant en sorte de les recevoir le plus tôt possible dans leur développement, afin de ménager une

période de récupération aussi longue que possible avant le début de l'essai. Les modalités d'acclimatation et les critères d'acceptation des lots sont décrits à l'Annexe 5. A la fin de l'essai, les éléuthéro-embryons sont généralement au stade NF47 (Annexe 4).

22. Les conditions d'encagement de *X. laevis* et les méthodes de soin adaptées à cette espèce sont décrites par Reed (Reed, 2005). Les méthodes de soin et de reproduction adaptées à *X. laevis* sont décrites dans la ligne directrice normalisée de l'ASTM (American Society for Testing and Materials) pour le FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay—Xenopus (ASTM, 2012)). Un protocole de reproduction complet figure à l'Annexe 6.

Milieu d'essai

23. Le milieu d'essai peut être tout type d'eau permettant une croissance et un développement normaux de *X. laevis*, y compris de l'eau minérale plate, de l'eau de source, de l'eau de puits ou de l'eau du robinet filtrée sur charbon actif, en bouteille de verre. La qualité de l'eau pouvant différer notablement d'une région à une autre, une analyse de la qualité de l'eau doit être pratiquée afin de détecter d'éventuels contaminants (métaux lourds, notamment) et produits chimiques pouvant interférer avec l'essai, en particulier si l'on ne dispose pas de données historiques montrant que l'eau est appropriée pour l'élevage de *X. laevis*. Une attention particulière sera accordée à la présence de cuivre, de chlore ou de chloramines, tous ces produits chimiques étant toxiques pour les éléuthéro-embryons de *X. laevis*. Les résultats de l'analyse de la qualité de l'eau seront notés dans le rapport. On trouvera à l'Annexe 7 certaines des caractéristiques chimiques d'un milieu d'essai adapté pour *X. laevis*. Au demeurant, tout milieu favorisant une croissance et un développement normaux de *X. laevis* et remplissant les critères de validité de l'essai est un milieu d'essai approprié.

Alimentation

24. Des éléuthéro-embryons entre les stades de développement NF45 (début de l'essai) et NF47 (fin de l'essai) sont utilisés pour cet essai. Ils ne sont pas nourris avant ou pendant l'essai, car du vitellus est encore présent dans l'intestin entre les stades NF45 et NF47 et est utilisé comme source d'énergie pour le développement de l'éléuthéro-embryon (Nieuwkoop et Faber, 1994).

Détermination de la fluorescence éventuelle du produit chimique testé

25. La présente Ligne directrice ne doit pas être utilisée pour tester des produits chimiques qui émettent une fluorescence entre 500 et 550 nm lorsqu'ils sont excités à des longueurs d'onde comprises entre 450 et 500 nm, et qui sont susceptibles de s'accumuler dans l'éléuthéro-embryon. Les produits chimiques présentant ces deux propriétés peuvent induire une fluorescence qui risque d'être interprétée comme un signal GFP, conduisant à identifier à tort le produit chimique testé comme un produit agissant sur la thyroïde. Un protocole simple permettant de déterminer si le produit chimique testé émet une fluorescence à ces longueurs d'onde est de placer 200 µL d'une solution du produit chimique testé à la concentration d'essai la plus élevée prévue pour le XETA et 200 µL de milieu d'essai dans deux puits d'une plaque de 96 puits et de quantifier la fluorescence en utilisant le même appareillage et les mêmes paramètres que pour la quantification de la fluorescence de l'éléuthéro-embryon. Si un produit chimique fluorescent est identifié, 20 éléuthéro-embryons de *X. laevis* de type sauvage devraient être exposés à 21 °C pendant 72 h avec un renouvellement quotidien à la concentration d'essai la plus élevée prévue pour le XETA, et la fluorescence devrait être quantifiée et comparée à la fluorescence d'un

groupe de 20 éleuthéro-embryons de type sauvage exposés au milieu d'essai seul dans les mêmes conditions. Si une différence de fluorescence statistiquement significative est observée, le produit chimique est fluorescent et s'accumule dans l'organisme de l'éleuthéro-embryon, et ne doit donc pas être testé par le XETA.

Sélection des concentrations d'essai

Établissement de la concentration d'essai maximale

26. Pour cet essai, la concentration maximale d'essai sera la plus basse des concentrations suivantes : limite de solubilité du produit chimique testé dans le milieu d'essai, concentration maximale tolérée (CMT), concentration maximale induisant des malformations chez moins de 10 % des éleuthéro-embryons, ou un maximum de 100 mg/L. Si des données provenant d'autres tests de toxicité aquatique sont disponibles (p. ex., études sur la CL50 chez les poissons, y compris les embryons de poissons, données QSAR ou possibilités de lecture croisée, ou données provenant d'autres espèces d'amphibiens), un jugement d'expert pourrait être utilisé pour informer la détermination de la concentration maximale d'essai.

27. La CMT est définie comme la concentration d'essai la plus élevée du produit chimique qui entraîne une mortalité aiguë inférieure à 10%. Une approximation utile de la CMT peut être dérivée des données de toxicité aiguë existantes comme 1/3 de la valeur aiguë de la CL50. Si une CL50 de *X. laevis* n'est pas disponible, on peut utiliser pour estimer le CMT la CL50 aiguë provenant d'autres espèces aquatiques (p. ex., des études de CL50 chez les poissons ou d'autres espèces d'amphibiens), 1/3. Il convient de noter que les études de toxicité aiguë sont normalement effectuées avec des adultes, par conséquent, les différences potentielles de sensibilité entre les stades de vie devraient être comptabilisées dans l'estimation de la CMT.

28. Si des données pertinentes sur la toxicité aiguë ne sont pas disponibles, avant de procéder à un test définitif, le laboratoire doit effectuer un test de recherche de portée avec des éleuthéroembryons *X. laevis* pour évaluer la toxicité éventuelle. Le détecteur de portée doit comporter au moins 2 concentrations d'essai, y compris la concentration d'essai la plus élevée choisie ou la MTC estimée. La concentration la plus élevée testée doit entraîner une mortalité aiguë de plus de 10%.

Gamme de concentrations d'essai

29. Un minimum de trois concentrations d'essai est requis, ainsi qu'un témoin milieu d'essai (et un témoin solvant si nécessaire). En règle générale, un facteur d'espacement des concentrations de 3 à 10 est recommandé.

Solutions d'essai

30. Les solutions d'essai sont généralement amenées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. Le pH de chaque solution d'essai devra être ajusté à une valeur comprise entre 6.5 et 8.5. On préparera les solutions mères en dissolvant le produit chimique testé dans le milieu d'essai par des moyens mécaniques tels que l'agitation, le brassage ou les ultrasons, ou par d'autres méthodes appropriées. Il convient d'éviter dans la mesure du possible l'usage de solvants. Pour les produits chimiques difficiles à tester, tels que les produits volatils ou absorbants, on se reportera au document d'orientation de l'OCDE N° 23 sur les essais de toxicité aquatique en phase aqueuse des produits chimiques difficiles à tester (OCDE, 2019).

31. Si un solvant est nécessaire pour obtenir une solution mère homogène à la concentration voulue, le niveau de solvant maximal devra être inférieur d'au moins un ordre de grandeur à la concentration sans effet observé (CSEO) et ne devra en aucun cas dépasser 100 µl/L ou 100 mg/L (OCDE, 2018b). Il est recommandé de maintenir la concentration de solvant à un niveau aussi bas que possible (< 20 µl/L, par exemple), afin d'éviter que le solvant puisse avoir une incidence sur les effets mesurés (Hutchinson et al., 2006).

32. Si un solvant est utilisé, la concentration de solvant devra être égale pour toutes les concentrations d'essai et tous les témoins. Il faudra réaliser à la fois un témoin solvant et un témoin milieu d'essai, ainsi qu'un témoin T3 et un témoin solvant T3, si le solvant n'a pas fait l'objet auparavant d'un test XETA donnant un résultat négatif. Idéalement, un XETA doit être réalisé pour chaque solvant non testé auparavant, en utilisant le solvant comme produit chimique testé afin d'établir si le solvant est positif ou négatif dans l'essai XETA. Une fois établie l'absence d'effet du solvant, un seul témoin (dépendant du cadre réglementaire, mais en principe le témoin eau) est suffisant lors de l'essai. Le choix d'un solvant approprié dépend des propriétés physicochimiques du produit chimique testé et de la sensibilité de *X. laevis* vis-à-vis du solvant choisi, qui sera déterminée de préférence lors d'un essai préliminaire. Les solvants suivants ont été utilisés avec succès dans le XETA : diméthylsulfoxyde (DMSO), éthanol, méthanol, acétone, acétonitrile. On notera qu'en dépit du fait que le DMSO a été utilisé avec succès dans le XETA, il ne devrait pas être privilégié, car il accroît la pénétration du produit chimique dans l'organisme.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

33. Les organismes sont exposés dans des plaques de 6 puits chimiquement inertes pour cultures cellulaires (classiquement des puits de 34 mm de diamètre intérieur et 20 mm de hauteur). Chaque puits contient dix organismes dans 8 mL de solution. Au cours d'une épreuve, 20 organismes sont exposés à chaque concentration d'essai. Chaque groupe témoin comprend 20 organismes (voir au paragraphe 11 la liste des groupes témoins). Si les plaques en plastique ne sont pas appropriées pour un produit chimique testé, on les remplacera par des récipients en verre (boîtes de Pétri de petit diamètre).

34. Les éléuthéro-embryons sont maintenus dans un incubateur pendant 72 ± 2 h à 21 ± 1 °C dans l'obscurité constante pendant toute la durée de l'essai.

Dosages analytiques

35. Comme une méthode de renouvellement semi-statique est utilisée, la stabilité de la concentration chimique d'essai doit être documentée. La stabilité du produit chimique d'essai devrait idéalement permettre à la concentration d'exposition de demeurer à moins de 20% de la concentration nominale dans un délai de 24 h. Analyse de la concentration d'essai la plus élevée et la plus basse au début de l'essai, à la fin du premier cycle de renouvellement (avant et après le renouvellement des solutions d'essai), et à la fin de l'essai est considéré comme l'exigence minimale. Vingt-quatre heures ± 2 h les périodes de renouvellement sont les plus longues périodes acceptées. Si les concentrations ne peuvent être maintenues à $\pm 20\%$ dans le système d'essai, des périodes de renouvellement raccourcies et/ou un préconditionnement du récipient d'essai avec les solutions d'essai pendant 24 h avant l'initiation afin de minimiser la perte chimique d'essai par adsorption pourraient être envisagés. L'utilisation de concentrations moyennes mesurées est permise pour les produits chimiques d'essai qui ne demeurent pas à moins de 80-120% de la

concentration nominale; Voir le document d'orientation de l'OCDE n ° 23 pour plus de détails (OCDE, 2019).

Lancement et conduite de l'essai

Jour 0

36. L'exposition doit débuter lorsque les éléuthéro-embryons atteignent le stade de développement NF45 (7 jours après la fertilisation à 21 °C ; Annexe 4).

37. Chaque épreuve doit être réalisée sur une seule et même ponte. L'essai comporte trois épreuves ; trois pontes sont donc utilisées par essai. Toutes les éléuthéro-embryons utilisés pour une épreuve doivent provenir de la même reproduction (les pontes de différentes femelles ne doivent donc pas être mélangées). Pour la sélection des animaux d'essai, les éléuthéro-embryons sont observés au microscope binoculaire à dissection, et ceux qui présentent des malformations nettement apparentes, une pigmentation anormale ou des atteintes physiques (queue endommagée, œdème, scoliose, par exemple) sont exclus de l'essai (Annexes 8 et 9). Les éléuthéro-embryons ayant un aspect sain et normal dans la population de stock doivent être réunis dans un même récipient contenant un volume approprié de milieu d'essai. Les organismes sélectionnés doivent être homogènes en taille, les éléuthéro-embryons présentant une nette différence de taille sont retirés. Les pontes comportant moins de 80 % d'éléuthéro-embryons normaux et sains au stade NF45 ne doivent pas être utilisées pour l'essai.

38. Pour la détermination du stade de développement, les éléuthéro-embryons sont retirés de la cuve où ils ont été réunis, au moyen d'une pipette de transfert, et isolés dans une goutte d'eau de dilution dans une boîte de Pétri transparente. Pour la détermination du stade, il est préférable de ne pas utiliser d'anesthésique. Si une anesthésie est néanmoins pratiquée, il convient de s'informer de la méthodologie appropriée pour l'usage du MS-222 (méthanesulfonate de tricaine), par exemple auprès de laboratoires expérimentés dans ce domaine, et de consigner la méthode dans le rapport d'essai. Le MS-222 est généralement utilisé à 0.1 g/L et tamponné au pH 7-8. Si les éléuthéro-embryons sont anesthésiés, le traitement anesthésique doit être appliqué de façon uniforme à tous les éléuthéro-embryons utilisés pour les trois épreuves du XETA. Les éléuthéro-embryons doivent être manipulés avec précaution lors de ce transfert, afin de limiter le stress de la manipulation et d'éviter toute blessure.

39. Le stade de développement est déterminé au microscope ou par une méthode appropriée d'imagerie numérique. Selon Nieuwkoop et Faber (Nieuwkoop et Faber, 1994), le principal repère de développement pour la sélection d'éléuthéro-embryons au stade NF45 est la morphologie de l'intestin. À ce stade, les spirales intestinales en sont à une rotation et demie (Annexe 4). Les caractéristiques morphologiques de l'intestin seront examinées au microscope. Il est recommandé de consulter le guide complet de Nieuwkoop et Faber (Nieuwkoop et Faber, 1994) pour plus d'informations sur la détermination du stade de développement des éléuthéro-embryons, mais ce repère morphologique saillant permet une détermination fiable.

40. La distribution des stades de développement chez *X. laevis* est homogène autour du stade NF45 (Mengeling et al., 2017). Il est donc recommandé de déterminer le stade de 10 % du nombre total d'organismes requis pour l'étude et de prévoir de débuter l'exposition au produit chimique testé lorsqu'au moins 80 % des éléuthéro-embryons examinés en sont au stade NF45. Il faut habituellement disposer de 180 organismes par épreuve. Il est recommandé de déterminer le stade de développement d'environ 18 individus sur le lot

destiné à l'essai. Si au moins 15 de ces organismes ont atteint le stade NF45, le lot est prêt pour le lancement de l'essai.

41. Pour débiter l'essai, 10 éléuthéro-embryons/puits sont placés dans des plaques 6 puits dans des gouttes de milieu d'essai (au moyen d'une pipette de transfert dont la pointe est coupée afin d'éviter de blesser les éléuthéro-embryons). Le milieu d'essai est retiré et les solutions de produit chimique testé sont ajoutées pour la première fois. On veillera à travailler sur une seule plaque à la fois, afin d'éviter le dessèchement des éléuthéro-embryons. On trouvera à l'Annexe 10 un exemple de configuration des plaques de 6 puits.

Jour 1 et jour 2

42. Les solutions de produit chimique testé et les solutions témoins doivent être renouvelées à 24 h et 48 h $\pm$ 2h. Chaque puits est inspecté en vue d'identifier les organismes ayant une apparence anormale (blessures, comportement natatoire anormal, etc.). Les organismes morts ou ceux qui présentent des malformations manifestes (Annexe 8) ou des blessures sont retirés et seront euthanasiés selon la procédure décrite au § 44. Toutes les observations doivent être consignées. Si une mortalité cumulée $> 10\%$ ou un taux de malformations cumulé $> 10\%$ est observé dans l'un des groupes témoins ou l'un des groupes traitement, ce qui laisse moins de trois concentrations d'essai non compromises, l'épreuve indépendante en cours est arrêtée et la source de mortalité ou d'anormalité doit être identifiée.

Jour 3 Quantification de la fluorescence

43. La fluorescence de chaque organisme est quantifiée après 72 ± 2 h d'exposition. Les éléuthéro-embryons sont transférés individuellement (un organisme par puits) dans les puits de plaques de 96 puits noires à fond conique pour la quantification de la fluorescence. À cet effet, les solutions d'essai sont d'abord renouvelées avec 8 mL de milieu d'essai, et les organismes morts ou ceux qui présentent des malformations manifestes sont retirés. Toutes les observations sont consignées. Si une mortalité cumulée $> 10\%$ ou un taux de malformations cumulé $> 10\%$ est observé dans l'un des groupes témoins ou l'un des groupes traitement, ce qui laisse moins de trois concentrations d'essai non compromises, l'épreuve indépendante en cours est arrêtée et la source de mortalité ou d'anormalité doit être identifiée. Les éléuthéro-embryons sont ensuite anesthésiés par addition de 2 mL de MS-222 1 g/L tamponné dans les puits. Pour éviter une anesthésie excessive, on n'anesthésie chaque fois que le nombre d'organismes nécessaire pour remplir une plaque de 96 puits. Après anesthésie complète (2 à 5 minutes), les éléuthéro-embryons sont placés individuellement dans chaque puits de la plaque de 96 puits. Il est recommandé de placer les organismes provenant d'un même puits de la plaque de 6 puits dans la même rangée de la plaque de 96 puits (de sorte que chaque rangée de la plaque de 96 puits corresponde à un puits de la plaque de 6 puits). On trouvera à l'Annexe 11 un exemple de plaque de 96 puits. Chaque organisme est placé en décubitus dorsal au moyen d'une pipette de transfert fine (aspirer et rejeter du milieu avec la pipette pour aider au retournement de l'éléuthéro-embryon), puis on retire presque tout le milieu en maintenant une humidité suffisante sous l'organisme. Les éléuthéro-embryons sont positionnés individuellement dans les puits avec la tête au centre du puits et la face dorsale en contact avec la base du puits. La queue est placée autour de la tête de l'éléuthéro-embryon. On trouvera à l'Annexe 12 une image du positionnement correct. La plaque de 96 puits contenant les organismes est alors placée dans le spectrofluorimètre ou sous le microscope à fluorescence afin de quantifier la fluorescence en utilisant les paramètres identifiés lors de l'étalonnage. Il est à noter qu'une

fois les éleuthéro-embryons placés sur le dos et le MS-222 retiré, il est important de procéder rapidement à la quantification de la fluorescence, afin d'éviter que les organismes ne se dessèchent. Si un spectrofluorimètre est utilisé pour quantifier le signal, au lieu d'un microscope à fluorescence, le risque existe que des schémas de fluorescence inhabituels, source potentielle de faux positifs, ne puissent pas être évalués.

Fin de l'expérience

44. Après lecture de la fluorescence, chaque puits de la plaque de 96 puits est rempli d'une solution de MS-222 tamponné (1 g/L) au moyen d'un flacon souple, afin d'euthanasier les éleuthéro-embryons. Les plaques de 96 puits sont éliminées conformément au protocole de sécurité du laboratoire.

Analyse des données / Évaluation des résultats d'essai

Considérations relatives à l'analyse des données

45. Les mesures de fluorescence provenant de puits dont on sait qu'ils sont vides doivent être éliminées des données avant toute analyse de données. Une troncation peut être réalisée avant l'analyse statistique, afin d'omettre pour chaque épreuve les 10 % de valeurs de fluorescence les plus élevées et les 10 % de valeurs les plus basses pour chaque groupe témoin et chaque groupe de concentration d'essai dopé et non dopé avec T3 (c'est-à-dire les deux valeurs les plus élevées et les deux valeurs les plus basses dans chaque groupe de 20 valeurs). Cette troncation vise à éliminer les valeurs provenant, dans le XETA, de divers événements tels qu'un tri défectueux des éleuthéro-embryons (taille ou pigmentation anormale), un mauvais positionnement des éleuthéro-embryons dans la plaque de 96 puits (dos vers le haut ou positionnement latéral), la mort d'éleuthéro-embryons après l'anesthésie ou des puits ne contenant pas d'organisme. Si un microscope à fluorescence est utilisé pour la quantification de la fluorescence, le contrôle de la qualité de l'image remplacera la troncation de 10 % pour éliminer les valeurs correspondant à ces événements avant l'analyse statistique. Le cas échéant, le nombre d'images retirées de l'analyse après le contrôle de qualité d'image doit être indiqué.

46. Les données des trois épreuves indépendantes sont réunies afin d'obtenir 42 (le pire des cas) à 60 valeurs de fluorescence pour chaque concentration et témoin.

47. Si un solvant a été utilisé pour la première fois lors de l'essai, une évaluation des effets éventuels du solvant sera réalisée. Pour cela, on procédera à une comparaison statistique du groupe témoin solvant et du groupe témoin milieu d'essai. S'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le témoin milieu d'essai et le témoin solvant, les valeurs de ces deux groupes seront réunies. Si une différence statistiquement significative supérieure à 12 % est détectée entre le témoin milieu d'essai et le témoin solvant sur l'ensemble des valeurs des trois épreuves, l'étude est compromise. Les épreuves seront alors considérées individuellement afin de déterminer si le solvant a un effet reproductible sur les trois épreuves. Si tel est le cas, l'étude est compromise et un nouvel essai XETA devra être réalisé en envisageant le recours à un nouveau lot de solvant ou à un autre solvant. Si seules une ou deux épreuves sont compromises, de nouvelles épreuves seront réalisées en changeant éventuellement de lot de solvant.

Analyse statistique

48. Des méthodes statistiques appropriées seront utilisées conformément au Document 54 de l'OCDE sur les approches actuelles de l'analyse statistique des données

d'écotoxicité et leur application (OECD, 2006). En règle générale, les effets sur la fluorescence d'un produit chimique testé par rapport au témoin sont analysés par un test de vérification d'hypothèse unilatéral pour $p < 0.05$.

49. Les tests de tendance descendants sont recommandés pour déterminer s'il existe des différences significatives ($p < 0.05$) entre le(s) témoin(s) et les différentes concentrations de produit chimique testé (OCDE, 2006). Les comparaisons seront effectuées soit par le test de Williams, soit par le test de Dunnett, afin de déterminer les différences statistiques (une démarche applicable pour l'analyse statistique des données obtenues par le XETA est décrite à l'Annexe 13).

Diagramme de décision

50. Un diagramme de décision a été établi pour le XETA, afin de fournir une aide à la conduite de l'essai et à l'interprétation de ses résultats (voir la graphique 2). Ce diagramme repose sur trois épreuves valides dont les données sont réunies en vue de l'analyse statistique (voir la graphique 1 au § 13). Un produit chimique testé est considéré comme donnant un résultat positif lors du XETA si au moins une concentration d'essai, dont la concentration la plus élevée, est active en mode dopé et/ou non dopé avec T3.

- En mode non dopé, une concentration active est définie comme une concentration donnant une augmentation de fluorescence statistiquement significative d'au moins 12 % par rapport au témoin milieu d'essai.
- En mode dopé avec T3, une concentration active est définie comme une concentration donnant une augmentation ou une diminution de fluorescence statistiquement significative d'au moins 12 % par rapport au témoin T3.
- Le seuil de 12 % a été établi à partir de l'analyse de puissance, qui a montré que la puissance excède 80 % pour toutes les configurations concentration-réponse simulées. Le caractère adéquat de ce seuil a été confirmé par les résultats des deux phases de validation montrant qu'aucun groupe de têtards traité avec un produit chimique de référence inactif ne donnait de variation statistiquement significative supérieure à 12 % (OCDE, à paraître).

51. Les réponses non monotones aux concentrations tendent à être courantes dans les essais mécanistiques (Parrott et al., 2017) et peuvent théoriquement être obtenues dans le XETA. Si plusieurs concentrations d'essai apparaissent comme actives mais que cette activité ne suit pas une relation concentration-réponse, ou si une ou plusieurs concentration(s) testée(s) apparaissent comme actives mais que la concentration d'essai la plus élevée est inactive, la reproductibilité de ce résultat doit être confirmée par une comparaison des résultats des trois épreuves du XETA. Si les résultats ne sont pas reproductibles, l'essai doit être répété, éventuellement en utilisant une autre plage de concentrations, afin de confirmer ce résultat (voir le logigramme de la graphique 2). Si le résultat est reproductible, le produit chimique testé est considéré comme actif sur la thyroïde dans le XETA.

52. Une diminution de la fluorescence en mode non dopé n'est pas un résultat attendu, car les éléuthéro-embryons ne synthétisent pas leur propre HT à ce stade de développement. Si une diminution de fluorescence statistiquement significative $> 12\%$ est observée en mode non dopé, cela pourrait indiquer que le produit chimique testé diminue la synthèse de GFP par un mode d'action qui n'est pas lié à la thyroïde, auquel cas le XETA n'est pas approprié pour le produit chimique testé, ou qu'un problème éventuel lié aux organismes ou aux conditions d'essai doit être recherché. Les épreuves seront examinées

individuellement afin de déterminer si la diminution statistiquement significative de la fluorescence est présente dans les trois épreuves, et un avis d'expert sera nécessaire pour décider s'il faut répéter une seule épreuve en utilisant un nouveau lot d'organismes, refaire l'essai complet en utilisant éventuellement une plage de concentrations plus basse, ou s'il faut recourir à un autre test d'étude de l'activité sur la thyroïde.

Graphique 2. Diagramme de décision pour l'interprétation des résultats du XETA.

Produit chimique testé fluorescent aux longueurs d'onde de la GFP ET bio-accumulatif ?	OUI	Envisager un autre type d'essai		
NON				
Conduire un essai XETA, réunir les données de trois épreuves valides et procéder à l'analyse statistique		Valide	NON	Répéter le XETA
		OUI		
		Diminution statistiquement significative de la fluorescence > 12 % en mode non dopé	OUI	Répéter le XETA en utilisant une plage de concentrations plus basse ou recourir à un autre type d'essai
		NON		
		Augmentation statistiquement significative de la fluorescence > 12 % en mode non dopé observée pour au moins une concentration ET incluant la concentration d'essai la plus élevée	OUI	Actif sur la thyroïde
		NON		
		Augmentation ou diminution statistiquement significative > 12 % en mode dopé observée pour au moins une concentration ET incluant la concentration d'essai la plus élevée	OUI	Actif sur la thyroïde
		NON		
		Augmentation ou diminution statistiquement significative > 12 % en mode dopé observée pour au moins une concentration n'incluant PAS la concentration d'essai la plus élevée OU absence d'augmentation selon la concentration en mode dopé ou non dopé	OUI	Vérifier pour chacune des trois épreuves la reproductibilité de la relation dose réponse et envisager de répéter le XETA en modifiant éventuellement la plage de concentrations
		NON		
		Inactif dans le XETA		

Note. La LD 150 de l'OCDE fournit des éléments complémentaires pour l'interprétation et l'extrapolation entre taxons des résultats du XETA (OCDE, 2018a).

Rapport d'essai

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

Produit chimique testé :

- Substance monoconstituant : apparence physique, solubilité dans l'eau et autres propriétés physicochimiques pertinentes ; identification chimique telle que désignation IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, degré de pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si cela est faisable en pratique, etc. (y compris la teneur en carbone organique s'il y a lieu). Informations sur la biodégradation, selon les données disponibles.
- Substances multiconstituants, UVBC et mélanges : caractérisés dans la mesure du possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physicochimiques pertinentes des constituants.
- Méthode analytique de dosage du produit chimique testé, et limite de quantification.
- Données disponibles ou résultats d'études préliminaires sur la stabilité ou la solubilité du produit chimique testé.
- Résultats relatifs à l'absence d'émission de fluorescence aux longueurs d'onde de 450 et 500 nm, et à l'absence d'accumulation dans les éléuthéro-embryons pour les substances dont il a été établi qu'elles sont fluorescentes à ces longueurs d'onde.

Espèce utilisée pour l'essai :

- Nom scientifique, lignée transgénique, fournisseur ou provenance, et conditions de culture.

Conditions expérimentales :

- Mode opératoire (notamment concentrations testées, température, durée, conditions semi-statiques, volume, nombre d'organismes par mL).
- Caractéristiques du milieu d'essai (référence de l'eau minérale ou de l'eau de source, description du traitement de l'eau du robinet (filtration sur charbon actif, par exemple)) et mesurages réalisés.
- Méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (le solvant et sa concentration doivent être indiqués, le cas échéant).
- Marque et références des plaques de 6 puits et de 96 puits utilisées pour l'exposition et la quantification de la fluorescence.
- Références et paramètres du spectrofluorimètre ou du microscope à fluorescence utilisé pour la quantification. La méthode utilisée pour l'analyse d'image doit également être indiquée dans ce dernier cas.

Résultats :

- Résultats d'études préliminaires éventuelles sur la CL50 ou la CMT du produit chimique testé.

- Concentrations d'essai nominales et résultats de toutes les analyses chimiques visant à déterminer la concentration du produit chimique testé dans les récipients d'essai ; concentration d'exposition mesurée sous la forme d'une moyenne statistique appropriée (par exemple moyenne arithmétique, moyenne pondérée dans le temps, etc.), s'il y a lieu ; on notera également dans le rapport le rendement de récupération de la méthode analytique et sa limite de quantification.
- Nombres d'organismes morts ou malformés dans chaque épreuve et jour de survenue.
- Données brutes de quantification de la fluorescence (données brutes individuelles, par exemple).
- Approche utilisée pour l'analyse statistique et le traitement des données, en particulier test statistique utilisé, et raisons ayant conduit à éliminer certaines données, le cas échéant.
- Données attestant que les témoins répondent aux critères de validité.
- Données attestant que tous les groupes répondent aux critères de validité pour ce qui est de la survie et des malformations.
- Les moyennes des valeurs de fluorescence de chaque groupe expérimental (incluant tous les témoins et toutes les concentrations de produit chimique testé) seront présentées à la fois sous forme graphique et sous forme de tableau.
- Pourcentage d'augmentation ou de diminution de la fluorescence pour chaque concentration par rapport à son témoin respectif en mode dopé et non dopé.
- S'il y a lieu, résultats de l'évaluation des effets éventuels du solvant : comparaison statistique du groupe témoin solvant et du groupe témoin milieu d'essai, s'ils sont inclus dans l'étude, ou résultat d'une étude antérieure montrant que le solvant donne un résultat négatif dans le XETA.
- Autres effets biologiques observés ou mesurés : indiquer tout autre effet biologique observé ou mesuré (comportement anormal, malformations ou pigmentation anormale, par exemple).
- Explication de tout écart par rapport à la Ligne directrice et aux critères d'acceptation ; considérations relatives aux conséquences possibles pour les résultats de l'essai.
- S'il y a lieu, présentation et commentaire de la liste de concentrations identifiées comme actives en mode dopé et non dopé.
- Conclusion indiquant si le produit chimique testé est classé comme actif ou inactif sur la thyroïde à l'issue de l'essai XETA

REFERENCES

- ASTM E1439-12. (2019). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX), ASTM International, West Conshohocken, PA. www.astm.org
- Fini, J.B., Le Mevel, S., Turque, N., Palmier, K., Zalko, D., Cravedi, J.P., Demeneix, B.A. (2007). An *in vivo* multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 5908–5914.
- Fini, J.B., Rui, A., Debrauwer, L., Hillenweck, A., Le Mevel, S., Chevolleau, S., Boulahtouf, A., Palmier, K., Balaguer, P., Cravedi, J.P., Demeneix, A., Zalko, D. (2012). Parallel biotransformation of tetrabromobisphenol A in *Xenopus laevis* and mammals: *Xenopus* as a model for endocrine perturbation studies. *Tox. Sci.*, 125(2): 359-367.
- Furlow JD, Brown DD. (1999) *In vitro* and *in vivo* analysis of the regulation of a transcription factor gene by thyroid hormone during *Xenopus laevis* metamorphosis. *Mol Endocrinol.* December;13(12):2076-89.
- Hellsten, U., Harland, R.M, Gilchrist, M.J., Hendrix, D., Jurka, J., Kapitonov, V., Ovcharenko, I., Putnam, N.H., Shu, S., Taher, L., Blitz, I.L., Blumberg, B., Dichmann, D.S., Dubchak, I., Amaya, E., Detter, J.C., Fletcher, R., Gerhard, D.S., Goodstein, D., Graves, T., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Kawashima, T., Lindquist, E., Lucas, S.M., Mead, P.E., Mitros, T., Ogino, H., Ohta, Y., Poliakov, A.V., Pollet, N., Robert J., Salamov, A., Sater, A.K., Schmutz, J., Terry, A., Vize, P.D., Warren, W.C., Wells, D., Wills, A., Wilson, R.K., Zimmerman, L.B., Zorn, A.M., Grainger, R., Grammer, T., Khokha, M.K., Richardson, P.M., Rokhsar, D.S. (2010). The genome of the Western clawed frog *Xenopus tropicalis*. *Science*, 328(5978), 633-636.
- Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. *Review. Aquat Toxicol* 76: 69–92.
- Leloup, J., Buscaglia, M. (1977). Triiodothyronine, hormone of amphibian metamorphosis. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Serie D*, 284, 2261–2263.
- Mengeling BJ, Wei Y, Dobrawa LN, Streekstra M, Louisse J, Singh V, Singh L, Lein PJ, Wulff H, Murk AJ, Furlow JD. (2017) A multi-tiered, *in vivo*, quantitative assay suite for environmental disruptors of thyroid hormone signaling. *Aquat Toxicol.* September;190:1-10.
- Nieuwkoop, P. D., Faber, J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing Inc, New York ISBN 0-8153-1896-0.
- OECD (1992). Test No. 301: Ready Biodegradability. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070349-en>.
- OECD (2006). Hypothesis Testing, in Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Chapter 5. OECD Series on Testing and Assessment no. 54, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264085275-en>.
- OECD (2009), Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264076242-en>.

OECD (2014a). Test No. 310: Ready Biodegradability - CO₂ in sealed vessels (Headspace Test). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264224506-en>.

OECD (2014b). Guidance document for single laboratory validation of quantitative analytical methods - guidance used in support of pre-and-post-registration data requirements for plant protection and biocidal products. Series on testing and assessment no. 204. OECD Publishing, Paris, [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2014\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2014)20&doclanguage=en).

OECD (2015), Test No. 241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264242340-en>.

OECD (2018a), Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>.

OECD (2019). Guidance document on aqueous-phase aquatic toxicity testing of difficult test chemicals series on testing and assessment no. 23 (second edition). OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris, [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2000\)6/REV1&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2000)6/REV1&doclanguage=en).

OECD (forthcoming). Validation of the xenopus eleutheroembryonic thyroid signaling assay (XETA) for the detection of thyroid active substances. (under development)

Parrott JL, Bjerregaard P, Brugger KE, Gray LE Jr, Iguchi T, Kadlec SM, Weltje L, Wheeler JR. (2017) Uncertainties in biological responses that influence hazard and risk approaches to the regulation of endocrine active substances. *Integr Environ Assess Manag*. March;13(2):293-301.

Reed, B.T. (2005). Guidance on the housing and care of the African clawed frog *Xenopus laevis*. Research Animals Department. RSCPA.

Shi (2000). Amphibian metamorphosis: from morphology to molecular biology, John Wiley and sons, Inc. ISBN 0-471-24475-9.

ANNEXE 1 : ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

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

CME0 : la concentration minimale avec effet observé est la concentration d'essai la plus faible à laquelle on observe que le produit chimique testé exerce un effet statistiquement significatif (pour $p < 0.05$).

CMT : concentration maximale tolérée. La CMT est définie comme la concentration du produit chimique testé la plus élevée entraînant moins de 10 % de mortalité aiguë.

CSE0 : la concentration sans effet observé est la concentration d'essai immédiatement inférieure à la CME0.

Éleuthéro-embryon : le développement éleuthéro-embryonnaire se situe après l'éclosion mais avant que l'embryon ne soit capable de se nourrir d'aliments exogènes ; c'est un stade au cours duquel le développement embryonnaire se poursuit. Dans certaines juridictions, la période éleuthéro-embryonnaire est considérée comme un stade de vie non protégé dans ce contexte (OCDE, 2014). Si l'on applique cette définition à *X. laevis*, cette période de développement va du stade NF36 (éclosion (Nieuwkoop et Faber, 1994)) au stade NF48 (épuisement du sac vitellin et début de l'alimentation autonome (Nieuwkoop et Faber, 1994 ; Marshall et Dixon, 1978)).

Épreuve : une épreuve est définie ici comme une expérience réalisée en utilisant des solutions indépendantes et une ponte indépendante.

GFP : Green Fluorescent Protein (protéine de fluorescence verte).

HT : hormones thyroïdiennes.

Mode dopé : partie d'une épreuve XETA réalisée en présence de 3.25 µg/l de T3.

Mode non dopé : partie d'une épreuve XETA réalisée en l'absence de T3.

MS-222 : (méthanesulfonate de tricaine ; CAS : 886-86-2).

PTU : propylthiouracile (CAS : 51-52-5).

RT : récepteur d'hormone thyroïdienne.

SEM : Standard Error of the Mean (erreur type de la moyenne).

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

T3 : triiodothyronine (CAS 6893-02-3).

T4 : thyroxine (CAS 51-48-9).

TH/bZIP : facteur de transcription à domaine bZIP dont l'expression est induite par l'hormone thyroïdienne.

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

Marshall JA, Dixon KE. (1978) Cell specialization in the epithelium of the small intestine of feeding *Xenopus laevis* tadpoles. J Anat. May;126 (Pt 1):133-44.

Nieuwkoop, P. D., Faber, J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing Inc, New York ISBN 0-8153-1896-0.

OECD (2014), Fish Toxicity Testing Framework, OECD Series on Testing and Assessment, n° 177, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264221437-en>.

ANNEXE 2 : CONDITIONS D'ESSAI POUR LE XETA

Animal d'essai		Éleuthéro-embryon de <i>X. laevis</i> TH/bZIP-GFP
Effet mesuré		Fluorescence totale de chaque éleuthéro-embryon
Période d'exposition		Stade NF45 (début de l'essai) à stade NF47 (fin de l'essai)
Durée de l'exposition		72 h ± 2 h
Régime d'exposition		Renouvellement après 24 h et 48 h. Pas d'alimentation.
pH		6.5 à 8.5
Conditions d'incubation pendant l'exposition		21 ± 1 °C, obscurité
Organismes par concentration		10 organismes par puits (plaque de 6 puits) x 2 puits (total de 20 organismes par concentration)
Volume de milieu d'essai		8 mL par puits
Milieu d'essai		Eau permettant une croissance et un développement normaux de <i>X. laevis</i> (cf. paragraphe 23).
Nombre d'épreuves		Trois épreuves sont réalisées pour chaque produit chimique testé, avec des larves provenant d'une ponte différente et des solutions fraîchement préparées.
Critères de sélection des individus inclus dans l'essai		Stade de développement (NF45), santé de l'animal (vivant et sans malformations), pigmentation homogène.
Critères de validité		pH 6.5-8.5, , mortalité ≤10 % dans tous les groupes témoins, malformations ≤10 % dans tous les groupes témoins. Induction d'une fluorescence >20 % chez le témoin T3 et >70 % chez le témoin T4. CV<30 % chez le témoin milieu d'essai. Au moins trois concentrations d'essai non compromises.
Concentration du produit chimique testé		La concentration du produit chimique testé doit rester pendant 24 heures dans les limites de ± 20 % de la valeur nominale ; à défaut, un résultat fondé sur les concentrations mesurées sera envisagé.
Témoins	Témoins	Milieu d'essai (fluorescence de base)
	Témoin T3	T3 (3.25 µg/L)
	Témoin T4	T4 (10 mg/L) (saturation du signal de fluorescence)

ANNEXE 3 : ÉTALONNAGE : RÉGLAGE OPTIMAL DES PARAMÈTRES DU SPECTROFLUORIMÈTRE

L'étalonnage a pour objet d'optimiser l'amplitude de la réponse de l'appareil en conditions simples. Avant de tester des produits chimiques, il est essentiel de faire en sorte que le lecteur de fluorescence assure avec T3 l'obtention d'une réponse dynamique adaptée aux concentrations.

L'étalonnage comporte deux étapes :

- 1) Détermination des paramètres optimaux du spectrofluorimètre pour l'obtention d'une amplitude satisfaisante d'induction de la GFP avec une concentration de T3 de 3.25 µg/L.
- 2) Application de ces paramètres à l'analyse quantitative lors de trois tests concentration-réponse avec T3, afin de vérifier l'amplitude de l'induction pour des concentrations croissantes de T3 et de déterminer la concentration la plus basse de T3 produisant une réponse GFP détectable.

1-Détermination des paramètres du spectrofluorimètre

- Avant de commencer le test :
 - Identifier les paramètres de réglage du modèle de spectrofluorimètre retenu.
 - Choisir une première combinaison de paramètres basée sur les réglages utilisés lors de la validation interlaboratoires du XETA (voir le rapport de validation du XETA (5), annexe 2) et/ou sur des expériences réalisées antérieurement avec le spectrofluorimètre choisi. On tiendra compte du fait que les réglages devrait permettre la lecture d'une plaque de 96 puits en moins de 30 min.
 - Identifier le paramètre qui doit être optimisé en premier.
- Préparer des solutions mères de T3 et T4 :
 - SOLUTION MÈRE DE T3 (10-2M) (6.51 G/L)
 - Cette solution mère peut être stockée 1 an à -20 °C.
 - Peser 100 mg de 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine dans une nacelle de pesée et verser délicatement dans un flacon volumétrique de 20 mL.
 - Rincer la nacelle avec 4.47 mL de NaOH 1N et ajouter délicatement dans le flacon volumétrique de 20 mL.
 - Mélanger doucement pendant 1 h avec un agitateur magnétique ; s'assurer que la solution est limpide.
 - Transférer 4.1 mL de la solution dans un nouveau flacon volumétrique de 20 mL ; ajouter 9.9 mL d'eau ultrapure.
 - Agiter pendant 1 h avec un agitateur magnétique.
 - Préparer suffisamment d'aliquotes de 30 µl dans des tubes Eppendorf de 0.5 mL pour remplir une boîte de stockage au congélateur.
 - Répartir les restes de solution éventuels dans des tubes de 1.5 mL.
 - Stockage : -20 °C pendant 1 an.
 - SOLUTION MÈRE DE T4 0.8 G/L

- Peser 40 mg de T4 dans une nacelle de pesée et verser délicatement dans un flacon volumétrique de 50 mL.
 - Rincer la nacelle avec 50 mL d'eau ultrapure et ajouter délicatement dans le flacon volumétrique.
 - Ajouter 0.1 mL de NaOH 1N.
 - Mélanger doucement pendant 1 h avec un agitateur magnétique ; s'assurer que la solution est limpide.
 - Préparer des aliquotes de 1 mL et stocker à -20 °C pendant 6 mois au maximum.
- Préparer les solutions suivantes :
 - Milieu d'exposition**
 - Placer 1 L de milieu d'essai dans une bouteille en verre de 1 L
 - Milieu d'exposition+T3 3.25 µg/L :**
 - Placer 1 L de milieu d'essai dans une bouteille en verre de 1 L
 - Ajouter 1 mL de T3 à 3.25 mg/l
 - Milieu d'exposition +T4 10 mg/L**
Préparer 300 mL de T4 (10 mg/L) :
 - Placer 296.25 mL de milieu d'essai dans une bouteille de 500 mL
 - Ajouter 3.75 mL de T4 à 0.8 g/L
 - Mélanger par agitation de la bouteille
 - Stocker à 4 °C dans l'obscurité
 - Exposer pendant 72 h 5 groupes de 20 témoins, 5 groupes de témoins T3 et 5 groupes de témoins T4 (dans des plaques de 6 puits, 10 organismes par puits) avec renouvellement quotidien comme indiqué dans la Ligne directrice.
 - Après 72 h, anesthésier les têtards avec du MS-222 et placer chaque organisme dans un puits séparé d'une plaque de 96 puits en veillant à ce qu'aucun des éléuthéro-embryons ne soit anesthésié pendant plus de 45 minutes.
 - Utiliser le spectrofluorimètre avec une première série de paramètres pour quantifier la fluorescence. Optimiser la quantification de la fluorescence en ajustant les paramètres (un seul paramètre à la fois).

Ne pas anesthésier un même éléuthéro-embryon pendant plus de 45 minutes. Une anesthésie plus longue entraînera la mort de l'organisme et se traduira par des artéfacts de fluorescence. Pour poursuivre l'étalonnage au-delà de 45 minutes, anesthésier trois nouveaux groupes d'organismes et charger une nouvelle plaque de 96 puits.

- Après l'acquisition des données, calculer la fluorescence moyenne et le CV (coefficient de variation) pour chaque groupe. Calculer le taux d'induction de fluorescence dans les groupes T3 et T4.

-Taux d'induction groupe T3 (RFU = relative fluorescence units)

$100 \times (\text{moyenne RFU groupe T3} - \text{moyenne RFU groupe témoin}) / \text{moyenne RFU groupe témoin}$

-Taux d'induction groupe T4 =

$100 \times (\text{moyenne RFU groupe T4} - \text{moyenne RFU groupe témoin}) / \text{moyenne RFU groupe témoin}$

Chaque paramètre sera optimisé de façon à :

-Obtenir une induction de fluorescence entre le groupe témoin et le groupe témoin T3, ainsi qu'entre le groupe témoin T3 et le groupe témoin T4, proches de celles observées lors de la validation du XETA :

- Induction de fluorescence entre le groupe témoin et le groupe témoin T3 allant de 30 à 75 %, avec une moyenne de 45 %.

- Induction de fluorescence entre le groupe témoin et le groupe témoin T4 allant de 70 à 190 %, avec une moyenne de 105 %.

-S'assurer que la saturation du spectrofluorimètre ne soit jamais atteinte avec les témoins T4.

-Parvenir à un temps total de lecture de la plaque de 96 puits de moins de 30 min (idéalement 20 min).

Après optimisation de l'ensemble des paramètres, répéter le test sur une nouvelle ponte pour confirmer les résultats.

2- Détermination de l'amplitude de l'induction de fluorescence et de la CMEO en utilisant des concentrations croissantes de T3

Ce test sera répété trois fois sur trois pontes différentes.

Concentrations à tester : 0 mg/L (témoin non traité), 26 µg/L ; 13 µg/L ; 6.5 µg/L ; 3.25 µg/L ; 2 µg/L ; 1.5 µg/L ; 1 µg/L ; 0.65 µg/L.

Préparation des solutions

Préparation de la solution de T3 à 3.25 mg/L :

Solution de T3 intermédiaire (0.65 g/L)

- Prélever une aliquote de la solution mère de T3 à 6.51 g/L (10⁻²M) stockée à -20°C
- Préparer une solution intermédiaire de T3 à 0.65 g/L (250 µL) :
 - Mettre 225 µL de milieu d'essai dans un Eppendorf de 1.5 mL
 - Ajouter 25 µL de T3 à 6.51 g/L
 - Mélanger au vortex

Solution de T3 à 3.25 mg/L

- Préparer 20 mL à 3.25 mg/L :
 - Mettre 19.9 mL de milieu d'essai dans un tube Falcon de 50 mL
 - Ajouter 100 µl de solution T3 à 0.65 g/L
 - Mélanger au vortex

Préparation des solutions d'essai T3 :

Nom de la solution	Concentration finale ($\mu\text{g/L}$)	Volume intermédiaire à préparer (mL)	Volume solution mère	Volume milieu d'essai (mL)	Volume final (mL)
T3_26	26	130.0	1.04 mL de T3 3.25mg/L	129.0	65.0
T3_13	13	130.0	65 mL de T3_26	65.0	55.0
T3_6.5	6.5	150.0	75 mL de T3_13	75.0	65.0
T3_3.25	3.25	170.0	85 mL de T3_6.5	85.0	65.4
T3_2	2	170.0	105 mL de T3_3.25	65.4	57.5
T3_1.5	1.5	150.0	113 mL de T3_2	37.5	63.3
T3_1	1	130.0	87 mL de T3_1.5	43.3	65.0
T3_0.65	0.65	100.0	65 mL de T3_1	35.0	100.0

Stocker les dilutions à 4 °C dans l'obscurité. Utiliser les dilutions pour l'exposition et les deux renouvellements.

Préparation des solutions de T4

- Mettre 60 mL de milieu d'essai dans une bouteille de 100 mL
- Prélever et éliminer 0.75 mL
- Ajouter 0.75 mL de T4 0.8 g/L
- Mélanger par agitation
- Stocker à 4 °C dans l'obscurité

Exposition et renouvellements***Exposition :***

- Préparer les solutions d'essai de T3 comme indiqué.
- Placer les éleuthéro-embryons triés dans des plaques de 6 puits, dans du milieu d'essai, à raison de 10 organismes par puits, en utilisant une pipette de transfert en plastique à pointe coupée pour éviter de blesser les éleuthéro-embryons. On veillera à n'inclure que des éleuthéro-embryons d'apparence saine, homogènes en taille et en pigmentation.
- Démarrer l'exposition en aspirant avec précaution la solution de milieu d'essai au moyen d'une pipette de transfert en plastique. Remplacer la solution de milieu d'essai par 8 mL de la solution appropriée.

Renouvellement :

Les solutions d'essai sont renouvelées à 24 et 48 $\pm$ 1 h

- Retirer les solutions mères appropriées du réfrigérateur et les placer à 21 $\pm$ 1 °C pendant au moins une heure avant le renouvellement.
- Retirer tout éleuthéro-embryon mort ou anormal.
- Aspirer avec précaution environ 90 % du milieu avec une pipette de 3 mL.

- Remplir chaque puits avec 8 mL de la solution de renouvellement appropriée.
- Placer les plaques dans un incubateur à 21 ± 1 °C dans l'obscurité.

Mesure de la fluorescence

Après 72 ± 2 h, procéder à l'anesthésie et placer les organismes dans des plaques de 96 puits comme indiqué dans la Ligne directrice, puis mesurer la fluorescence. Procéder au traitement de données et à l'analyse statistique afin d'établir la CMEO comme indiqué dans la Ligne directrice.

Interprétation des résultats :

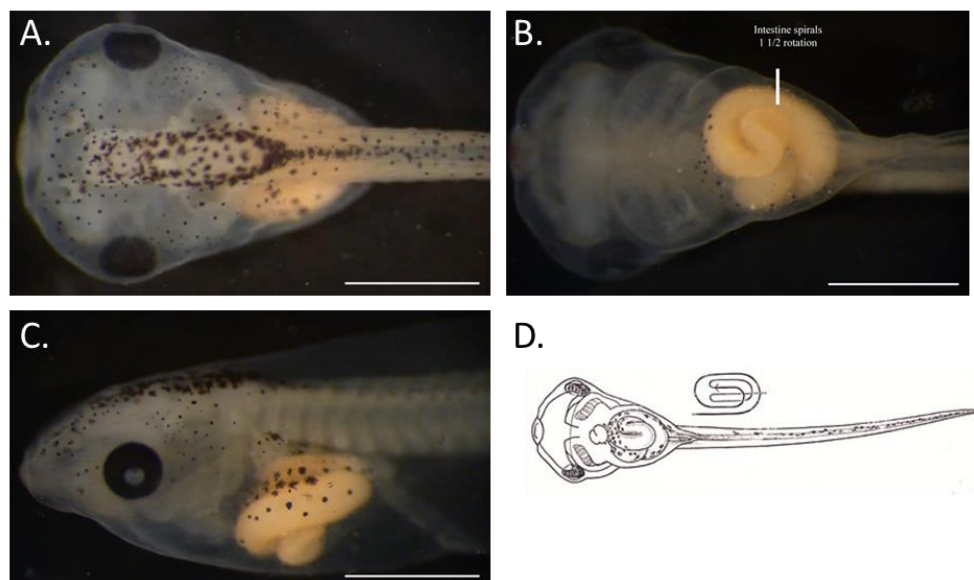
Comme pour les tests décrits plus haut, les résultats doivent montrer :

- Une induction de fluorescence entre témoin et groupe témoin T3, ainsi qu'entre témoins T3 et témoins T4 proches de celles observées lors de la validation (voir ci-dessus).
- Que la saturation du spectrofluorimètre n'est jamais atteinte dans le groupe T4.

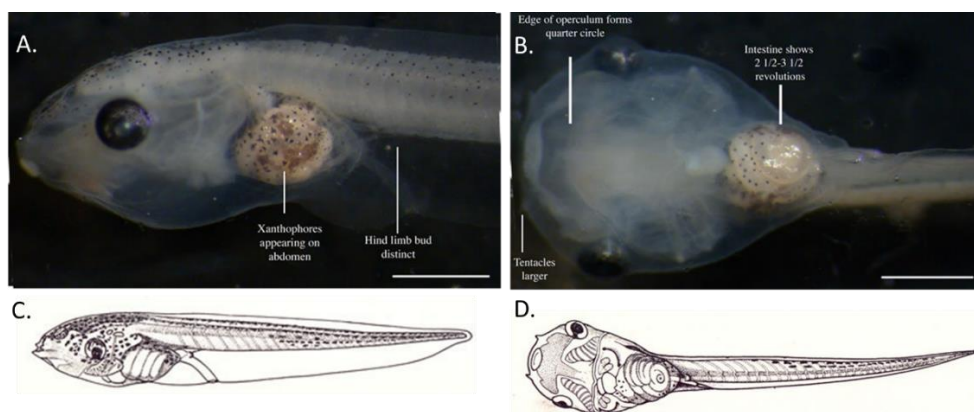
La CMEO obtenue pour T3 doit être inférieure ou égale à 3.25 µg/L.

Si les résultats ne sont pas en conformité avec ces trois points, les paramètres du spectrofluorimètre devraient être ajustés.

ANNEXE 4 : IDENTIFICATION DES ÉLEUTHÉRO-EMBRYONS AUX STADES NF45 ET NF47



Éleuthéro-embryon au stade NF45 : vue dorsale (A), vue ventrale montrant les spirales intestinales (B), vue latérale (C) et dessin d'une vue ventrale (D). http://wiki.xenbase.org/xenwiki/index.php/Stage_45. Barre = 2.5 mm



Éleuthéro-embryons au stade NF47 : au stade NF47, les spirales intestinales atteignent deux rotations et demie à trois rotations et demie, les xanthophores apparaissent sur l'abdomen et les bourgeons des membres postérieurs deviennent visibles. Vue latérale montrant les xanthophores apparaissant sur l'abdomen (A), vue ventrale montrant les spirales intestinales (B) et dessin des vues latérale et ventrale (C et D). http://wiki.xenbase.org/xenwiki/index.php/Stage_47

ANNEXE 5 : RÉCEPTION DES EMBRYONS : ACCLIMATATION ET ACCEPTATION DES LOTS

- Le laboratoire doit recevoir les embryons au plus tard 3 jours avant le début de l'essai, afin que la récupération et l'acclimatation puissent se faire correctement.
- . Les lots ne doivent être acceptés que si l'occurrence d'embryons morts ou anormaux représente moins de 20% entre la réception du lot et le début de l'exposition.

Consignes relatives aux embryons reçus trois jours avant le début du XETA :

- **Ne pas mélanger les embryons provenant de différentes pontes.**
- Trier les embryons pour éliminer les embryons morts ou anormaux, qui doivent représenter moins de 20 % du lot ; à défaut, le lot ne sera pas utilisé pour le XETA.
- Transférer uniquement les embryons vivants et en bonne santé d'une même ponte dans un aquarium de 10 litres contenant du milieu d'essai.
- La densité maximale est de 800 embryons par aquarium de 10 litres.
- Mettre les embryons en incubation sans éclairage à $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (dans l'obscurité).
- Après l'étape ci-dessus, ne pas renouveler le milieu dans le réservoir jusqu'au début de l'essai.

ANNEXE 6 : REPRODUCTION

On décrira ici comment les laboratoires peuvent élever leurs propres éléuthéro-embryons.

Le matériel spécifique suivant est nécessaire pour ce faire :

- Microscope binoculaire
- Solution chlorée (100 %)
- Solution de gentamycine
- Solution de cystéine à 2 %, pH 7.5-8
- (dés-gly, D-ala, pro-NH₂) LHRH, acétate, stocker à -20 °C
- Gonadotrophine chorionique humaine (HCG), stocker à 4 °C
- Solution de milieu MMR (Marc's Modified Ringer's) 0.1X + gentamycine 50 µg/L
- Seringues, 5 mL et 1 mL
- Aiguille pour seringue (aiguille rose) ; G 18 1 ½
- Aiguille pour seringue (aiguille orange) ; G 25 5/8
- Bécher de 250 mL destiné à contenir les œufs (stade blastula)

On lancera la reproduction un lundi, pour un essai devrait débuter le lundi ou le mardi suivant.

Exemple de calendrier de reproduction (commençant le lundi de la semaine précédant l'essai)

Jour	Activité	Détails
Lundi précédant le début de l'essai	Accoupler un mâle TH/bZIP-GFP et une femelle de type sauvage adultes de <i>X. laevis</i> .	Injecter des hormones aux deux sexes (LHRH pour le mâle et HCG pour la femelle) afin d'induire la reproduction. Placer les <i>Xenopus</i> ensemble dans le même réservoir.
Mardi	Débarrasser les œufs fertilisés de la gelée qui les entoure (les dissocier) avec de la cystéine à 2 % ; trier les embryons sains (au stade blastula) et les mettre à incuber dans l'obscurité à 21 ± 1 °C.	Séparer les amas d'œufs en cas de pontes multiples.
Mercredi	Trier les embryons sains et rafraîchir le milieu avec MMR + gentamycine, mettre à incuber dans l'obscurité à 21 ± 1 °C.	
Jeudi	Trier et rafraîchir le milieu comme ci-dessus. Mettre à incuber pour le weekend dans l'obscurité à 21 ± 1 °C.	
Lundi suivant	Démarrer l'essai	Les éléuthéro-embryons devraient être au stade NF45. Cela devrait être confirmé par la détermination du stade de développement des euleutheroembryos

Préparation des solutions pour la reproduction :

MMR (20X) Solution mère

Pour 2 L :

- 234 g de NaCl
- 6 g de KCl
- 3.8 g de MgCl_2
- 11.76 g de CaCl_2
- 48 g d'HEPES

Mettre les poudres dans une bouteille en verre de 2 L

Ajouter de l'eau distillée QSP 2 L

Ajuster le pH avec NaOH 1N à 7.5-8

Stocker à 4 °C pendant 2 mois maximum

MMR (0.1X) à partir de MMR 20X

Pour 10 L :

- Verser 50 mL de MMR 20X dans un récipient de 10 L
- Compléter jusqu'à 10 L avec de l'eau distillée
- Ajuster le pH à 7.5-8 avec NaOH 1N
- Stocker à température ambiante lors de l'utilisation (2 semaines maximum)

MMR (0.1X) + gentamycine 50 µg/L

- Mettre 2 mL de gentamycine 50 mg/L dans un flacon volumétrique de 2 L
- Compléter jusqu'à 2 L avec du milieu MMR 0.1X
- Couvrir le flacon avec du Parafilm
- Mélanger en retournant plusieurs fois
- Stocker à température ambiante lors de l'utilisation (2 semaines maximum)

Cystéine 2%, pH 7.5-8

- Pour 100 mL
- Peser 2 g de cystéine
- Ajouter 90 mL de MMR 0.1X
- Ajuster le pH à 7.5-7.7 avec NaOH 10N, puis 1N
- Compléter jusqu'à 100 mL avec du MMR 0.1X
- Utiliser uniquement le jour de la préparation

Préparation de la solution de gonadolibérine (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) (acétate de l'hormone de libération de la lutéinostimuline, Leutenizing hormone-releasing hormone [LHRH]) :

- Retirer du congélateur à -20 °C le tube contenant la poudre d'acétate de LHRH (GnRH) reçue du fournisseur.
- Re-suspendre la poudre (5 mg) directement dans le tube avec 720 µL d'eau stérile (solution mère : 6.94 µg/µL) ; diluer 6 µL de solution mère dans 1 mL d'eau stérile (solution finale 41.64 µg/mL) ou, pour un volume plus important, diluer 90 µL de solution mère dans 15 mL d'eau stérile.
- Préparer des aliquotes de 1 mL dans des tubes Eppendorf stériles de 1.5 mL.
- Stocker les aliquotes à -20 °C.

Préparation de la solution d'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) :

- Se faire livrer par le fournisseur un flacon de 5000 unités d'hCG en poudre.
- Avec une seringue stérile, injecter 5 mL de chlorure de sodium à 0.9 % dans le tube d'hCG afin d'obtenir une concentration de 1 unité par µL.
- Mélanger par agitation manuelle.
- Toute solution non utilisée peut être stockée à 4 °C pendant deux semaines maximum.

PROTOCOLE DE REPRODUCTION

Lundi : procéder à des injections hormonales afin d'induire l'accouplement du mâle et de la femelle adultes *X. laevis*.

Le mâle *X. laevis* peut recevoir une injection de GnRH ou de hCG :

Injection de GnRH (acétate de LHRH) aux mâles :

- À titre de référence, lire les pp. 126 et 127 de The Laboratory XENOPUS sp. De Sherill L. Green. Une vidéo d'une injection sous-cutanée dans le sac lymphatique dorsal se trouve à l'adresse <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=890> (Cross and Powers 2008)
- Prendre une aliquote de GnRH (41.64 µg/mL) au congélateur à -20 °C et décongeler à température ambiante.
- Pour limiter le stress, immobiliser la grenouille en lui couvrant les yeux.
- Avec une aiguille 25 gauge (orange) et une seringue de 1 mL contenant 0.120 mL de solution de GnRH décongelée, procéder à l'injection sous-cutanée. Pour que la totalité du volume injecté reste dans le xénope, l'aiguille d'injection doit être insérée sous la peau au niveau de la partie supérieure du membre inférieur, et doit progresser de manière sous-cutanée, parallèlement au muscle, pour passer la ligne latérale et atteindre les sacs dorsaux lymphatiques. On peut alors injecter le produit, et l'on pourra observer que celui-ci forme une bulle sous la peau dans le sac lymphatique. Lorsque l'aiguille aura été retirée avec précaution, la bulle restera jusqu'à absorption par le système lymphatique, sans aucune fuite du produit injecté, car les organes de la ligne latérale sont accolés à la musculature, ce qui prévient toute perte du volume injecté.

Injection de hCG aux mâles :

- Avec une seringue de 1 mL et une aiguille 25 gauge (orange), aspirer 10-25 unités de hCG (selon la taille de la grenouille).
- Immobiliser la grenouille sur du torchon papier humide, sur une paille, et lui masquer les yeux comme le montre la photo ci-après.

- Procéder à une injection dorsale sous-cutanée au niveau du sac lymphatique dorsal, en suivant les instructions précédentes pour l'injection.

Injection de hCG aux femelles :

- Avec une seringue de 1 mL et une aiguille 25 gauge (orange), aspirer 500-700 unités de hCG (selon la taille de la grenouille). *Nota : on injectera 500 unités pour une grenouille de moins de 9 cm et 700 unités pour une grenouille de taille égale ou supérieure à 9 cm.*
- Immobiliser la grenouille en lui masquant les yeux.
- Procéder à une injection dorsale sous-cutanée au niveau du sac lymphatique dorsal, en suivant les instructions précédentes pour l'injection.

Mardi : (trier et incuber)

- Récolter les œufs et les débarrasser de la gelée qui les entoure :
 - Récolter les œufs dans un bécher de 250 mL, retirer l'eau en excès
 - Ajouter suffisamment de cystéine à 2 % pour couvrir les œufs, mélanger les œufs avec la cystéine en faisant tourner le bécher pendant 2 ou 3 min jusqu'à ce que les œufs soient dissociés. On veillera à ne pas laisser la cystéine trop longtemps, car cela affecterait la survie. Cette étape est critique et doit être réalisée avec précaution. La solution de cystéine doit être conditionnée à ~21 °C. La température a une incidence sur l'efficacité du traitement à la cystéine, et peut également avoir une incidence sur la santé des embryons, s'ils subissent un choc thermique.
 - Stopper l'action de la cystéine en ajoutant du MMR 0.1X dans le bécher (presque jusqu'en haut).
 - Retirer le liquide en le versant doucement dans un bécher de solution chlorée et rincer à nouveau 3 fois avec du MMR 0.1X.
 - Placer les embryons dans de grandes boîtes de Pétri de 100 mL dûment annotées, en versant doucement le contenu du bécher.
- Trier les embryons (morts/vivants), la plupart des embryons devraient être au stade blastula :
 - Placer la boîte sous un microscope binoculaire et, en utilisant une pipette de transfert à pointe coupée pour éviter d'endommager les œufs, isoler chaque œuf fertilisé dans une nouvelle boîte de Pétri de 100 mL contenant du MMR 0.1X + de la gentamycine 50 µg/L. On trouvera une description des œufs pouvant se trouver dans la boîte de Pétri à l'Annexe 7 : tri des œufs fertilisés.

Annoter la boîte de Pétri : nom de la lignée, date d'accouplement, nombre d'œufs par boîte. Incuber les boîtes de Pétri dans l'obscurité à 21 ± 1 °C.

Mercredi : (trier et renouveler le milieu)

- Retirer les boîtes de Pétri de l'incubateur.
- Trier les embryons, retirer les morts, utiliser comme la veille une pipette de transfert à pointe coupée.
- Renouveler la moitié du milieu, et recharger en MMR 0.1X + gentamycine 50 µg/L.
- Mettre les boîtes de Pétri à incuber dans l'obscurité à 21 ± 1 °C.

Jeudi : (préparer l'essai ou expédier à un autre laboratoire)

Option 1 : poursuivre la culture jusqu'au démarrage de l'essai

- Remplir un aquarium au $\frac{1}{4}$ de MMR 0.1X.
- Annoter l'aquarium en indiquant le nom de la lignée et la date de reproduction.
- Verser doucement les embryons dans l'aquarium sans mélanger les pontes, ne pas dépasser 200 embryons/L.
- Placer l'aquarium dans un incubateur à 21 °C dans l'obscurité pour le weekend.

Option 2 : Expédier les embryons à un autre laboratoire

Matériel nécessaire pour l'expédition :

- Conteneur stérile de 100 mL (flacon pour culture de tissus, par exemple, avec bouchon à vis)
- Pipettes de transfert à pointe coupée
- Pipettes (50 mL)
- Aide au pipetage

Nota : on veillera à n'emballer les embryons que juste avant l'expédition, pour réduire le stress.

- Annoter le conteneur de 100 mL en indiquant sur le bouchon et sur le conteneur :
 - « Nom de la lignée »
 - « Date de reproduction »
 - « Nombre d'embryons/conteneur »
- Ajouter 50 mL de milieu d'essai dans le conteneur.
- Placer 100 embryons vivants dans le conteneur.
- Ne fermer le conteneur que lorsqu'il est prêt à être envoyé.
- Placer le conteneur dans un sac de congélation à fermeture hermétique.
- Fermer le sac.
- Placer le conteneur dans une boîte en polystyrène en le calant de telle sorte qu'il ne bouge pas dans la boîte.
- Fermer et scotcher soigneusement la boîte.
- Adresser au laboratoire destinataire par courrier livré le lendemain.

**ANNEXE 7 : QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE
EAU DE DILUTION ACCEPTABLE**

Alcalinité 10 – 250 mg/L CaCO₃

Dureté = 75-150 mg/L

pH = 6.5-8.5

Salinité = 0.4 mg/L

Conductivité = 50 -2000 µS/cm

Ammoniaque non ionisée (NH₃) < 0.02 mg/L

Nitrite (NO₂⁻) < 1 mg/L

Nitrate (NO₃⁻) < 50 mg/L

Chlore résiduel <10 µg/L

Teneur en oxygène dissous > 80 % de saturation

CO₂ < 5 mg/L

Pesticides organophosphorés totaux <50 ng/L

Pesticides organochlorés totaux plus biphényles polychlorés <50 ng/L

Chlore organique total < 25 ng/L

Aluminium, Arsenic, Chrome, Cobalt, Cuivre, Fer, Plomb, Nickel, Zinc : < 1 µg/L chaque

Cadmium, Mercure, Argent : < 100 ng/L chaque

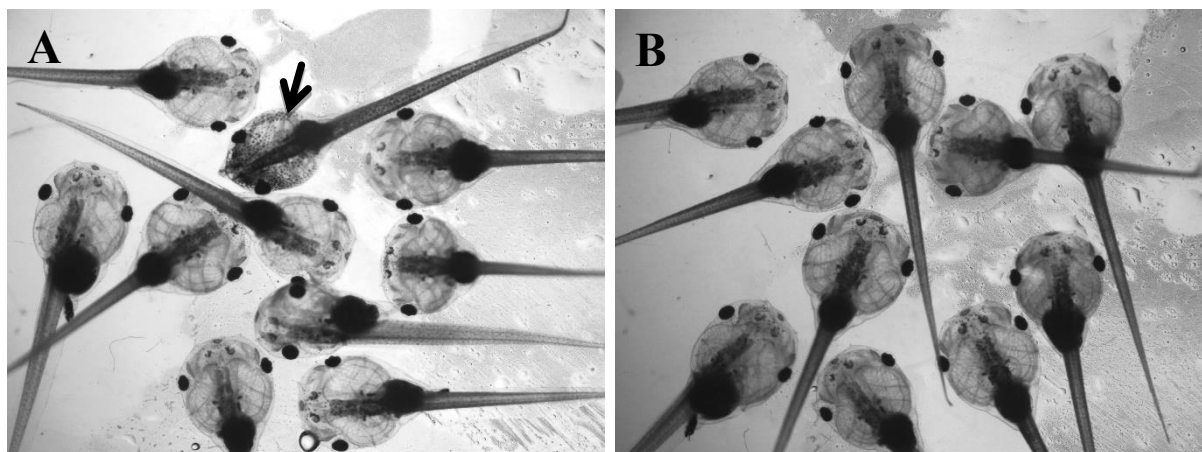
**ANNEXE 8 : SUPPORTS PHOTOGRAPHIQUES D'AIDE À
L'IDENTIFICATION DES ÉLEUTHÉRO-EMBRYONS NORMAUX ET
ANORMAUX**



Éleuthéro-embryon normal (A). Éleuthéro-embryon anormal : pigmentation et microcéphalie (B), œdème et malformations diverses (C et D).

ANNEXE 9 : TRI DES ÉLEUTHÉRO-EMBRYONS : PIGMENTATION INHABITUELLE

Des éleuthéro-embryons dont les mélanophores présentent une apparence inhabituelle se trouvent souvent parmi les larves de *X. laevis* et doivent être éliminés des organismes d'essai, car la pigmentation peut interférer avec la quantification de la fluorescence. Ces éleuthéro-embryons seront euthanasiés par la méthode décrite au paragraphe 44.



La photographie A montre un exemple de ponte d'éleuthéro-embryons de pigmentation hétérogène, un éleuthéro-embryon présentant des mélanophores d'apparence inhabituelle (flèche). La photographie B montre un exemple de ponte de pigmentation homogène.

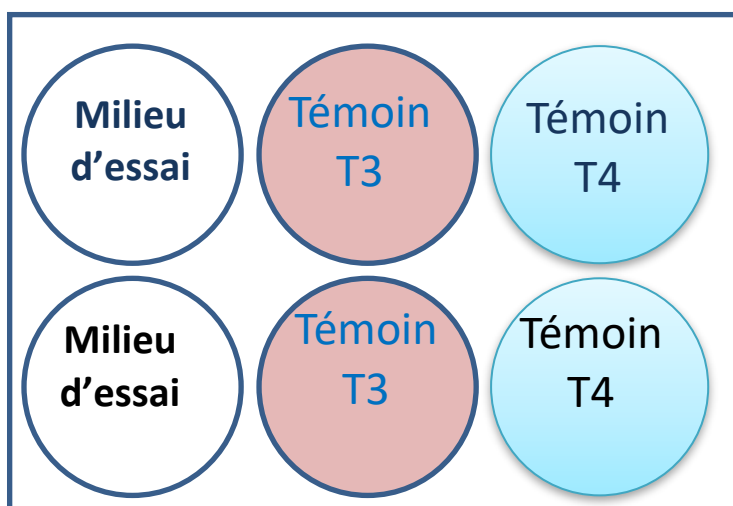
ANNEXE 10 : EXEMPLE DE CONFIGURATION DES PLAQUES DE SIX PUIITS

Exemple de disposition des expositions sur les plaques de 6 puits pour une épreuve :

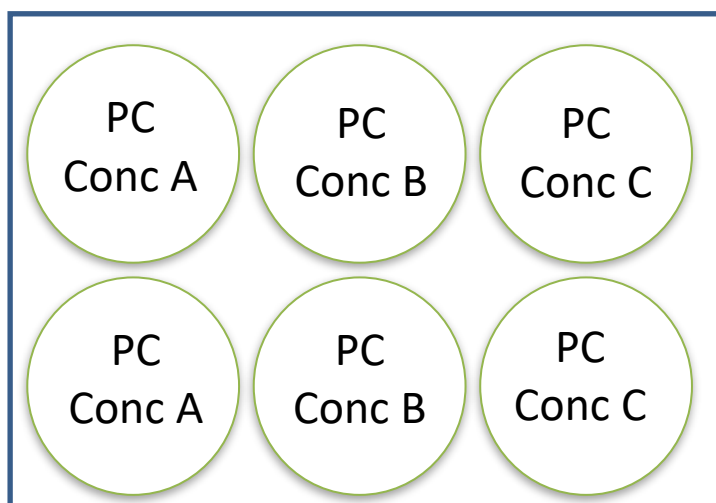
- 10 éleuthéro-embryons par puits
- 3 plaques sont nécessaires au total pour l'essai d'un produit chimique

L'essai XETA utilise 180 éleuthéro-embryons par épreuve, soit 540 pour les trois épreuves

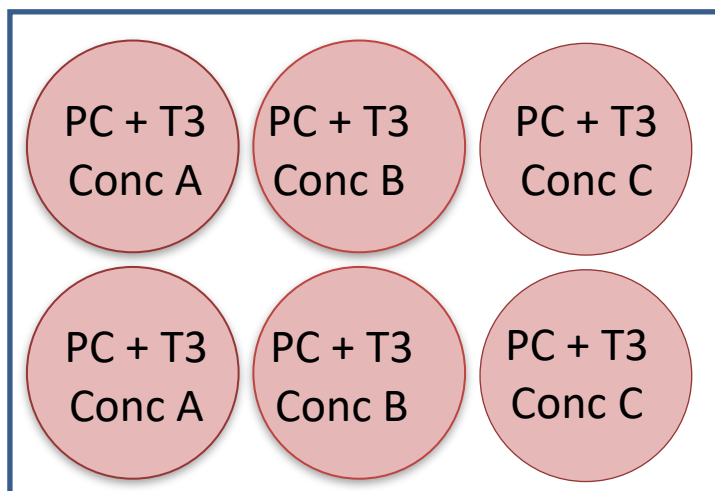
Plaque témoin (1 plaque) : trois témoins



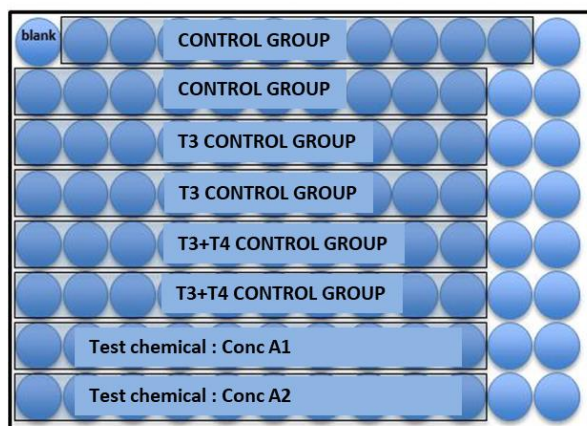
Produit chimique testé (PC) 1 plaque – un produit chimique, 2 x 3 concentrations



Produit chimique testé + T3 (1 plaque – un produit chimique + T3, 2 x 3 concentrations)

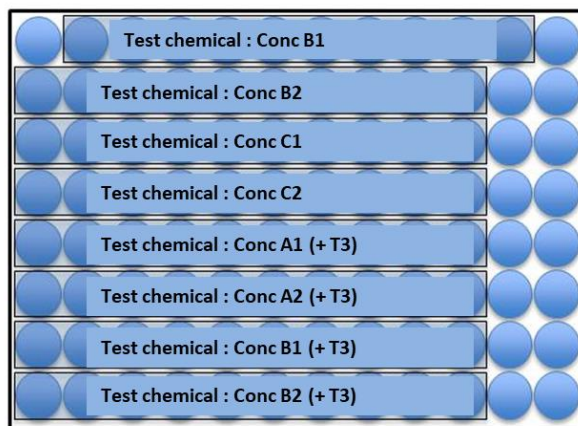


ANNEXE 11 : SCHÉMA DES PLAQUES DE 96 Puits POUR LA LECTURE DE LA FLUORESCENCE



Plaque en haut à gauche :

blanc	groupe témoin
	groupe témoin
	groupe témoin T3
	groupe témoin T3
	groupe témoin T3+T4
	groupe témoin T3+T4
	Produit chimique testé : conc A1
	Produit chimique testé : conc A2

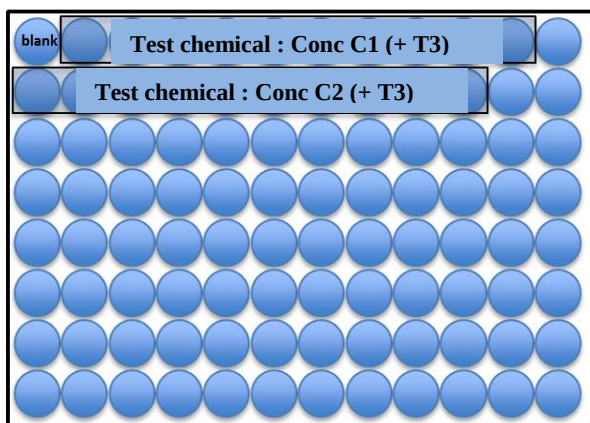


Plaque en haut à droite :

Produit chimique testé : conc B1
Produit chimique testé : conc B2
Produit chimique testé : conc C1
Produit chimique testé : conc C2
Produit chimique testé : conc A1 (+T3)
Produit chimique testé : conc A2 (+T3)
Produit chimique testé : conc B1 (+T3)
Produit chimique testé : conc B2 (+T3)

Plaque en bas à gauche :

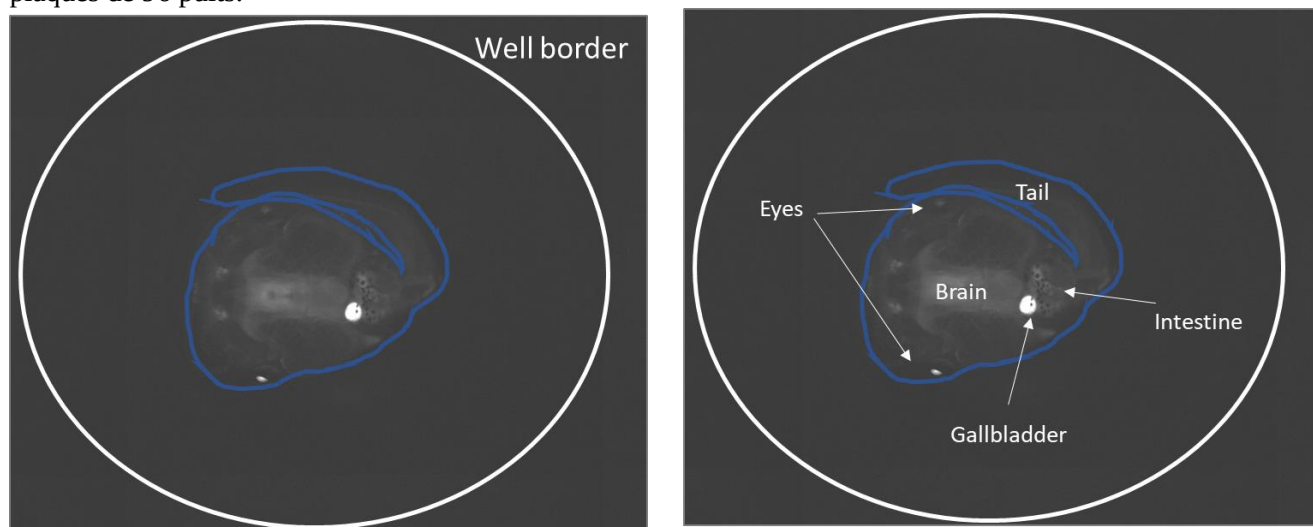
blanc	Produit chimique testé : conc C1 (+T3)
	Produit chimique testé : conc C2 (+T3)



ANNEXE 12 : POSITIONNEMENT DES ÉLEUTHÉRO-EMBRYONS

Graphique 3. Image obtenue par imagerie de fluorescence GFP d'un éleuthéro-embryon TH/bZIP-GFP dans un puits d'une plaque de 96 puits.

La figure ci-dessous illustre le positionnement que doivent avoir les éleuthéro-embryons dans les puits des plaques de 96 puits.



Note : L'image montre le schéma type obtenu pour un témoin T3.

Well border = Contour du puit
Eyes = Yeux
Tail = Queue
Intestine = Intestin
Gallbladder = Vésicule biliaire
Brain = Cerveau

ANNEXE 13 : MÉTHODES D'ANALYSE STATISTIQUE DES DONNÉES DU XETA

Cette annexe décrit une démarche applicable à l'analyse statistique des données obtenues dans le XETA.

Procéder à une troncation à 10 % pour chaque groupe de concentration d'essai, en omettant dans les valeurs de fluorescence de chaque groupe les 10 % les plus élevées et les 10 % les plus basses. Une troncation à moins de 10 % peut être pratiquée sur la base d'un avis d'expert. Cette étape est optionnelle et on lui préférera un contrôle de la qualité de l'image si la quantification de la fluorescence se fait par imagerie.

Pratiquer une analyse de variance (ANOVA) combinant le traitement, comme seul facteur fixe, avec les facteurs aléatoires suivants : épreuve, interaction épreuve par traitement, et puits imbriqué au sein des épreuves par traitement. Calculer la variance de chaque différence, en réponses moyennes, entre chaque traitement et le groupe témoin. Utiliser ces variances et les degrés de liberté de l'ANOVA dans un test de Williams classique. On trouvera chez [Green JW, Springer TA, Holbech H 2018. Statistical Analysis of Ecotoxicity Studies. Wiley. ISBN: 978-1-119-48881-1] un programme utilisable pour ces calculs.

Construire un histogramme, un diagramme Q-Q ou un diagramme à tige et feuilles des résidus, et évaluer visuellement la compatibilité avec une distribution normale et une identification des valeurs aberrantes.

Idéalement, un histogramme des résidus devra ressembler à une courbe en cloche, symétrique autour de zéro et en décroissance de part et d'autre. Le diagramme Q-Q devra être à peu près linéaire. Un jugement d'expert peut être utilisé pour déterminer si un histogramme ou un diagramme Q-Q est compatible avec la normalité ou indique la présence d'une ou plusieurs valeurs aberrantes. Une autre solution consiste à pratiquer un test de normalité de Shapiro-Wilk ou Anderson-Darling sur la base d'un seuil de signification de 0.01. On notera qu'un grand jeu de données peut se traduire par un résultat significatif (indiquant une non-normalité) alors même qu'il n'y a pas lieu de s'inquiéter.

Réaliser un diagramme des résidus en fonction du traitement pour identifier une éventuelle hétérogénéité de la variance ou obtenir des indications complémentaires sur les valeurs aberrantes. Une autre option est de pratiquer un test de Levene (ou similaire) pour un seuil de signification de 0.01.

Si les diagrammes ou les tests formels indiquent une non-normalité ou une variance hétérogène qui ne peut pas être éliminée en omettant quelques valeurs aberrantes, répéter les étapes ci-dessus après transformation logarithmique ou racine carrée des données.

Une fois trouvée une transformation se traduisant par la normalité et une stabilisation de la variance, appliquer le test de Williams pour la tendance croissante et séparément pour une tendance décroissante sur la base de l'ANOVA du troisième paragraphe de la présente Annexe.

Examiner l'ensemble des moyennes traitement, le cas échéant, à partir du test de Williams. Si au moins trois concentrations d'essai adjacentes sont combinées par l'algorithme PAVA sous-jacent au test de Williams, examiner si les moyennes traitement (non amalgamées) sont compatibles avec une relation concentration-réponse monotone. Si les données ne sont pas compatibles avec une monotonie, le test de Williams n'est pas approprié et il convient de recourir au test de Dunnett. Nota : si le test de Dunnett est utilisé, l'ANOVA ci-dessus devra inclure le test de Dunnett pour comparer les traitements au témoin. Un test bilatéral devra être utilisé, à moins qu'il ne soit scientifiquement justifié de n'attendre de changement

que dans une direction. Nota : le test de Dunnett est pratiqué pour un seuil de signification de 0.05, indépendamment du test F dans l'ANOVA.

Appliquer la règle des valeurs aberrantes de Tukey pour identifier les valeurs aberrantes de l'ANOVA. Si des valeurs aberrantes sont identifiées et que les résultats témoignent d'une non-normalité ou d'une hétérogénéité de la variance, répéter l'ANOVA et le test de Dunnett en omettant les valeurs aberrantes. Si les problèmes de normalité et d'hétérogénéité de la variance disparaissent et que le test de Dunnett identifie la même CSEO qu'avec la totalité des données, accepter la CSEO. Nota : le test de Williams établit une CSEO par défaut, qui ne doit pas nécessairement être considérée comme le résultat du XETA mais est à utiliser pour identifier les concentrations actives et classer le produit chimique testé en potentiellement actif ou inactif sur la thyroïde (voir paragraphe 45-52)).

Le logigramme de la graphique 4 reprend les grandes lignes de la démarche.

Graphique 4. Logigramme pour l'analyse statistique de la fluorescence

