

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

Essai de métamorphose des amphibiens

INTRODUCTION

1. Le développement et la validation d'un essai, capable de déceler les substances actives sur le système thyroïdien chez les vertébrés, sont devenus nécessaires du fait des inquiétudes relatives à la présence dans l'environnement de produits chimiques dans des teneurs susceptibles de provoquer des effets néfastes sur les humains et la faune. En 1998, l'OCDE a lancé une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les Lignes directrices existantes ou à établir de nouvelles Lignes directrices pour le dépistage et les tests des substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien. Un des axes de cette activité consistait à développer une nouvelle Ligne directrice pour le dépistage des substances actives sur le système thyroïdien chez les vertébrés. Une version étendue du document intitulé Toxicité orale à doses répétées pendant 28 jours sur les rongeurs (Ligne directrice pour les essais n° 407) et un essai de métamorphose des amphibiens (EMA) ont été proposés. La Ligne directrice LD 407 ainsi amendée a été soumise à validation, avant d'être publiée dans une nouvelle mouture révisée. L'essai de métamorphose des amphibiens (EMA) a suivi un programme de validation complet, comprenant des études intralaboratoires et interlaboratoires visant à en démontrer la pertinence et la fiabilité (1, 2). La validation de l'essai a ensuite fait l'objet d'un examen par les pairs, constitués d'un jury d'experts indépendants (3). La présente Ligne directrice est donc le fruit de l'expérience acquise au cours des études de validation concernant la détection de substances actives sur la thyroïde, ainsi que des travaux menés par ailleurs au sein des pays membres de l'OCDE.

PRINCIPE DE L'ESSAI

2. L'essai de métamorphose des amphibiens (EMA) est un essai de dépistage visant à identifier de manière empirique les substances susceptibles de perturber le fonctionnement normal de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien (HHT). L'EMA constitue un modèle généralisé pour les vertébrés, dans la mesure où il se fonde sur des fonctions et des structures conservées de l'axe HHT. Cet essai est important, car la métamorphose des amphibiens est un processus bien étudié, dépendant de la thyroïde, et répondant aux substances actives sur l'axe HHT. De plus, il s'agit du seul essai existant capable de détecter l'activité sur la thyroïde chez un animal en cours de développement morphologique.

3. Le schéma expérimental général comprend l'exposition de têtards de *Xenopus laevis* au stade 51 à un minimum de trois concentrations différentes d'une substance d'essai ainsi qu'à un témoin d'eau pure pendant 21 jours. Chaque traitement d'essai est effectué avec quatre répliquats. La densité des larves au lancement de l'essai s'élève à 20 têtards par vivier ou répliquat pour l'ensemble des groupes traités. Les observations rapportées sont la longueur des pattes postérieures, la longueur museau-cloaque (LMC), le stade de développement, le poids humide, l'histologie de la thyroïde et la mortalité quotidienne.

© OCDE, (2009).

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

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE***Espèces utilisées dans l'essai***

4. *Xenopus laevis* est une espèce élevée couramment dans les laboratoires du monde entier, et aisément accessible auprès de fournisseurs commerciaux. Sa reproduction peut être induite facilement tout au long de l'année au moyen d'injections de gonadotrophine chorionique humaine (hCG), les larves ainsi obtenues peuvent être élevées en grand nombre de manière systématique jusqu'aux stades de développement voulus, afin d'appliquer des protocoles d'essai spécifiques au stade de développement. Dans le cadre du présent essai, il est préférable d'utiliser des larves issues d'adultes élevés *in situ*. Bien qu'il ne s'agisse pas de la procédure privilégiée, il est également possible de transférer les œufs et les embryons à partir d'un autre laboratoire menant cet essai, et de leur permettre de s'acclimater. En revanche, l'expédition d'animaux au stade larvaire destinés à l'essai n'est pas acceptable.

Équipement et fournitures

5. Le matériel suivant est nécessaire à la conduite de l'essai:
- a. système d'exposition (voir la description ci-dessous);
 - b. aquariums en verre ou en acier inoxydable (voir la description ci-dessous);
 - c. viviers de reproduction ;
 - d. appareil de contrôle de la température (p. ex., dispositifs de chauffage et de refroidissement réglables à 22 ± 1 °C);
 - e. thermomètre;
 - f. microscope binoculaire à dissection;
 - g. caméra numérique dotée d'une résolution minimale de 4 mégapixels et d'une fonction micro;
 - h. logiciel de numérisation des images;
 - i. boîtes de Petri (p. ex. 100 x 15 mm) ou chambre de plastique transparent de taille comparable;
 - j. balance analytique d'une précision de 3 décimales (mg);
 - k. appareil de mesure de l'oxygène dissous;
 - l. pH-mètre;
 - m. appareil de mesure de l'intensité lumineuse capable de fournir des résultats en lux;
 - n. divers outils et éléments de verrerie de laboratoire;
 - o. pipettes réglables (10 à 5 000 µL) ou série de pipettes de tailles équivalentes;
 - p. quantités suffisantes de substance d'essai pour mener l'étude, de préférence issues du même numéro de lot;
 - q. instruments d'analyse adaptés à la substance d'essai, ou recours à des services d'analyse contractuels.

Testabilité des produits chimiques

6. L'EMA est fondé sur un protocole d'exposition en milieu aquatique selon lequel la substance d'essai est introduite dans le récipient d'essai par le biais d'un système d'écoulement continu. Les méthodes par écoulement continu sont néanmoins soumises aux contraintes relatives au type de substances pouvant être soumise à l'essai, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Par conséquent, avant la mise en œuvre de ce protocole, il convient de collecter les informations de référence sur le produit chimique en question pour déterminer sa testabilité, et de consulter la publication intitulée OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures (4). Parmi les caractéristiques indiquant d'éventuelles difficultés pour un test en milieu aquatique figurent: des coefficients de partition eau/octanol

(logK_{ow}) élevés, une volatilité importante, une tendance à l'hydrolyse et à la photolyse dans les conditions d'éclairage ambiant d'un laboratoire. D'autres facteurs peuvent entrer en jeu dans la détermination de la testabilité, et font l'objet d'une évaluation au cas par cas. Si l'utilisation d'un système d'écoulement continu ne permet pas de tester la substance, il est possible de recourir à un dispositif de renouvellement statique. Dans le cas où aucune des solutions n'est adaptée à la substance d'essai, celle-ci ne peut donc pas être soumise au présent protocole.

Système d'exposition

7. Un système de dilution par écoulement continu est préférable, si possible, à un dispositif de renouvellement statique. Si les propriétés physiques et/ou chimiques de l'une des substances d'essai ne permettent pas de recourir à un système de dilution par écoulement continu, un procédé d'exposition différent (p. ex. avec renouvellement statique) peut être employé. Les composants du système sont constitués d'un matériau adapté au contact avec l'eau, comme le verre, l'acier inoxydable ou le Teflon®. Certaines matières plastiques appropriées peuvent toutefois être utilisées à condition qu'elles ne perturbent par l'étude. Les viviers d'exposition sont constitués d'aquariums de verre ou d'acier inoxydable, équipés de conduites verticales maintenant le volume d'eau entre 4.0 et 10.0 L et une profondeur minimum du milieu de 10 à 15 cm. Le système prend en charge l'ensemble des concentrations d'exposition ainsi que le témoin, avec quatre répliquats par traitement. La vitesse d'écoulement de chaque vivier est constante afin de garantir la stabilité des conditions biologiques et de l'exposition chimique (par exemple 25 mL/min). Les viviers sont disposés de manière aléatoire au sein du système d'exposition, pour amoindrir les effets éventuellement liés à la position, comprenant notamment de légères variations de température, d'intensité lumineuse, etc. Un éclairage fluorescent est apporté selon un cycle de 12 h de lumière/12 h d'obscurité, avec une intensité à la surface de l'eau comprise entre 600 et 2 000 lux (lumens/m²). Dans chaque vivier d'essai, les conditions sont maintenues aux valeurs suivantes : température de l'eau à 22 ± 1 °C, pH entre 6.5 et 8.5, et concentration d'oxygène dissous (OD) supérieure à 3.5 mg/L (> 40 % de la saturation de l'air). Ces valeurs sont contrôlées au minimum une fois par semaine, la température étant de préférence mesurée en permanence dans au moins un des récipients d'essai. L'annexe 1 présente les conditions expérimentales nécessaires à l'exécution de ce protocole. Pour des informations complémentaires concernant la mise en place de systèmes d'exposition à écoulement continu et/ou renouvellement statique, veuillez vous reporter au guide de l'ASTM intitulé *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (5) et aux essais de toxicologie aquatique généraux.

Qualité de l'eau

8. Toute eau disponible localement (par exemple: eau de source ou eau du robinet filtrée sur charbon) et permettant la croissance et le développement normaux des têtards de *X. laevis* peut être employée. Dans la mesure où la qualité de l'eau est susceptible de varier de façon importante d'une zone à l'autre, elle est évaluée, en particulier en l'absence de données historiques concernant l'usage de cette eau pour élever des xénopes. Il convient de vérifier avec soin que l'eau ne contient pas de cuivre, de chlore ou de chloramines, tous ces produits chimiques étant toxiques pour les grenouilles et les têtards. Il est également recommandé d'analyser les concentrations de fluorure, perchlorate et chlorate (produits secondaires issus de la désinfection de l'eau potable) dans le milieu aquatique, puisque tous ces anions sont des substrats des transporteurs d'iode de la glande thyroïde, et que des teneurs élevées de chacun de ces ions sont susceptibles de perturber les résultats de l'essai. L'analyse est réalisée avant le lancement des essais, et l'eau utilisée dans ce cadre ne contient donc normalement pas ces anions.

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

9. La synthèse d'hormones par la glande thyroïde repose sur des apports suffisants d'iode aux larves, assurés par une combinaison de sources aqueuses et alimentaires. Il n'existe aujourd'hui aucune

recommandation d'origine empirique concernant les concentrations d'iode minimales. Cependant, la disponibilité de l'iode est susceptible d'affecter la capacité de réponse du système thyroïdien aux agents actifs sur la thyroïde, un facteur par ailleurs connu pour influencer l'activité basale de cette glande : ce point mérite d'être pris en compte lors de l'interprétation des résultats d'histopathologie de la thyroïde. C'est pourquoi les concentrations d'iode mesurées dans le milieu aquatique utilisé pour l'essai sont rapportées. D'après les données accessibles des études de validation, les concentrations de l'iodure (I) dans l'eau de l'essai étaient situées entre 0.5 et 10 µg/L. Dans l'idéal, cette concentration ne devrait pas chuter en dessous de 0.5 µg/L. Lorsque l'essai est mené avec de l'eau désionisée, un supplément d'iode est nécessaire afin d'atteindre cette concentration minimum de 0.5 µg/L. Tout nouvel ajout d'iode ou d'autres sels à l'eau de l'essai est notifié dans le rapport.

Maintenance des animaux

Soin et reproduction des adultes

10. Le soin et la reproduction des adultes s'inscrivent en accord avec les guides standard (6). Pour des informations plus détaillées, le lecteur est invité à se reporter au guide des normes en matière d'essai FETAX. Ces guides standard présentent un exemple des méthodes de soin et de reproduction adaptées, sans qu'il ne soit nécessaire de s'y conformer strictement. Pour provoquer la reproduction, des couples (3 à 5) d'adultes mâles et femelles reçoivent une injection de gonadotrophine chorionique humaine (hCG). La dose injectée aux femelles et aux mâles s'élève respectivement à environ 800 UI – 1 000 UI et 600 UI – 800 UI de hCG dissout dans une solution saline à 0.6 – 0.9 %. Les couples de reproducteurs sont placés dans de grands viviers, à l'abri des perturbations et dans des conditions statiques, en vue de stimuler l'amplexus. Chaque vivier de reproduction est équipé d'une grille en plastique ou en acier inoxydable en guise de faux plancher, permettant aux amas d'œufs de tomber dans un double fond. Si les grenouilles reçoivent une injection en fin d'après-midi, elles déposent habituellement la majorité de leurs œufs vers le milieu de la matinée suivante. Lorsqu'une quantité suffisante d'œufs ont été libérés et fertilisés, il convient de retirer les adultes des viviers de reproduction.

Soin et sélection des larves

11. Une fois que les adultes ont quitté les viviers de reproduction, les œufs sont collectés et évalués en termes de viabilité en se fondant sur un sous-échantillon d'embryons représentatifs issus de tous ces viviers. Le ou les meilleurs frais produits par un individu (2 à 3 sont recommandés pour évaluer la qualité des frais) sont retenus, d'après des critères liés à la viabilité et à la quantité des embryons (s'élevant à 1 500 minimum). Tous les organismes employés dans l'étude sont issus d'un même frai, ce qui implique que les frais ne soient pas mélangés les uns aux autres. Les embryons sont transférés dans une boîte ou un récipient plat, et tous les œufs manifestement morts ou anormaux (voir la définition en (5)) sont retirés à l'aide d'une pipette. Les embryons sains de chacun des trois frais sont alors placés dans trois viviers différents d'éclosion. Quatre jours après ce transfert, le meilleur frai est sélectionné, sur des critères de viabilité et de succès de l'éclosion, et les larves sont réparties dans un nombre approprié de viviers d'élevage à 22 ± 1 °C. En outre, d'autres larves sont hébergées dans des viviers supplémentaires pour servir de doublure dans l'hypothèse où une mortalité serait observée dans les viviers d'élevage pendant la première semaine. Cette procédure maintient une densité d'individus cohérente, ce qui limite les divergences de développement au sein d'une cohorte issue d'un même frai. L'ensemble des viviers d'élevage sont vidés quotidiennement. Par précaution, les gants vinyle ou nitrile sont préférés aux gants en latex. Les individus décédés sont retirés tous les jours et remplacés par les larves prévues à cet effet afin de maintenir une densité d'organismes constante pendant la première semaine. Les larves sont alimentées au moins deux fois pas jour.

12. Pendant la phase de pré-exposition, les têtards sont acclimatés aux conditions correspondant à la phase d'exposition réelle, y compris le type de nourriture, la température, le cycle lumière/obscurité et le

milieu d'élevage. Il est donc recommandé d'employer la même eau pour la dilution/l'élevage au cours des phases de pré-exposition puis d'exposition. Lorsqu'un système d'élevage statique est utilisé lors de la pré-exposition des têtards, le milieu est intégralement renouvelé au moins deux fois par semaine. Il convient d'éviter le surpeuplement, dû à des densités de larves importantes pendant la période de pré-exposition, car ces conditions sont susceptibles de fortement perturber le développement des têtards lors de la phase d'essai consécutive. Aussi la densité ne doit-elle pas dépasser environ quatre têtards par litre de milieu d'élevage (dans le cas d'un système d'exposition statique) ou dix têtard par litre de milieu d'élevage (avec p. ex. une vitesse d'écoulement de 50 mL/min dans le système d'élevage ou de pré-exposition). Dans ces conditions, les têtards se développent pour passer du stade 45/46 au stade 51 en douze jours. Le stade de développement des têtards représentatifs de la population de cette lignée est évalué quotidiennement afin de déterminer le bon moment pour entamer la phase d'exposition. Il convient d'être attentif à stresser et perturber les têtards le moins possible, en particulier pendant les déplacements, le nettoyage des aquariums et la manipulation des larves. De même, toute activité ou condition stressante est évitée, notamment les bruits forts et/ou constants, les vibrations et coups au niveau des aquariums, l'activité excessive en laboratoire et les changements brusques de l'environnement (exposition lumineuse, température, pH, OD, vitesse d'écoulement, etc.). Si les têtards ne se développent pas jusqu'au stade 51 dans les 17 jours qui suivent la fertilisation, l'excès de stress est considéré comme une des causes éventuelles de ce retard.

Alimentation et élevage des larves

13. Les têtards sont nourris avec, par exemple, du Sera Micron® (Sera GmbH, Heinsberg, Allemagne) pendant la période de pré-exposition (après le stade Nieuwkoop Faber (NF) 45/46) et durant toute la phase d'essai de 21 jours, ou tout autre régime alimentaire ayant fait preuve des mêmes performances dans le cadre d'un essai de métamorphose des amphibiens. Pendant la période de pré-exposition, le régime alimentaire est soigneusement ajusté aux demandes des têtards en développement. En pratique, de petites portions de nourriture sont apportées aux larves nouvellement écloses plusieurs fois par jour (au moins deux fois). Néanmoins, l'excès de nourriture est à éviter *i)* pour maintenir la qualité de l'eau *ii)* pour prévenir l'encrassement des filtres des branchies avec des particules alimentaires et des détritiques. En cas d'emploi de Sera Micron®, les rations quotidiennes sont augmentées au cours de la croissance des têtards jusqu'à atteindre environ 30 mg/animal/jour, peu avant le début de l'essai. Sera Micron® est un aliment pour têtard disponible dans le commerce, dont les études de validation ont révélé l'aptitude à permettre une croissance et un développement corrects des larves de *X. laevis*. Divisé en fines particules, il reste en suspension dans la colonne d'eau pendant une longue période, et peut être entraîné par l'écoulement. La dose quotidienne de nourriture est donc répartie en portions réduites, apportées au moins deux fois par jour. Dans le cas de Sera Micron®, le régime alimentaire est présenté dans le Tableau 1. Le rythme d'alimentation est enregistré. Sera Micron® peut être administré sous forme sèche ou mis en réserve en solution dans l'eau de dilution. Une telle solution de réserve est préparée de nouveau un jour sur deux, et conservée à 4 °C quand elle n'est pas utilisée.

Tableau 1. Régime alimentaire des têtards de *X. laevis* pendant la phase de l'EMA où les animaux sont en vie, en condition d'écoulement continu

Jour d'étude	Ration alimentaire (mg de Sera Micron®/animal/jour)
0 – 4	30
5 – 7	40
8 – 10	50
11 – 14	70
15 – 21	80

Analyse chimique

14. Avant de lancer l'étude, il convient d'évaluer la stabilité de la substance d'essai en se penchant sur les informations disponibles en termes de solubilité, de dégradabilité et de volatilité. Des échantillons des solutions d'essai de chaque vivier répliqué pour chacune des concentrations sont soumis à des analyses chimiques au début de l'essai (jour 0), et une fois par semaine pendant son déroulement pour un minimum de quatre échantillons. Il est également conseillé d'analyser chaque concentration d'essai lors de la préparation du système afin d'en vérifier les performances, avant de lancer l'essai. L'analyse des solutions de réserve est en outre recommandée à chaque fois qu'elles sont renouvelées, en particulier si leur volume ne correspond pas aux quantités de produits chimiques suffisantes pour couvrir l'ensemble de la période d'échantillonnage de routine. Si les produits chimiques se révèlent indétectables à certaines, voire toutes les concentrations prévues pour l'essai, les solutions de réserve sont analysées et les vitesses d'écoulement du système sont enregistrées en vue de calculer les concentrations nominales.

Introduction des substances chimiques

15. La méthode employée pour introduire la substance d'essai dans le système est variable en fonction des propriétés physico-chimiques du produit concerné. Les composés hydrosolubles peuvent être mis en solution en aliquotes dans l'eau utilisée pour l'essai à des concentrations aboutissant à la teneur voulue dans le cadre d'une introduction au moyen d'un système d'écoulement continu. Les produits chimiques liquides à température ambiante mais peu solubles dans l'eau peuvent être introduits avec les méthodes de saturation liquide-liquide. Les substances chimiques solides à température ambiante et faiblement hydrosolubles peuvent être introduites par saturation avec colonne de laine de verre (7). Les systèmes dépourvus de véhicules sont préférables, cependant les différentes substances d'essai possèdent des propriétés physico-chimiques variables, qui réclament des approches diverses pour la préparation des solutions aqueuses visant à l'exposition chimique. La priorité demeure néanmoins de chercher à éviter les solvants et autres véhicules, car : *i*) certains solvants sont par eux-mêmes susceptibles de se révéler toxiques et/ou d'induire des réponses endocriniennes indésirables ou inattendues, *ii*) l'essai de produits chimiques à une concentration supérieure à leur solubilité dans l'eau (ce qui arrive fréquemment si des solvants sont utilisés) peut fausser la détermination des concentrations efficaces, et *iii*) le recours aux solvants dans les essais à long terme peut se traduire par la formation importante de biofilms associés à l'activité microbienne. En présence de substances d'essai difficile à tester, le solvant n'est utilisé qu'en dernier ressort, et le document intitulé OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures (4) est consulté afin de déterminer la meilleure méthode à employer. Le choix du solvant est guidé par les propriétés chimiques de la substance concernée. Parmi les solvants qui se sont révélés efficaces pour les essais de toxicité aquatique figurent l'acétone, l'éthanol, le méthanol, le diméthylformamide et le triéthylène glycol. Si un solvant est employé comme véhicule, ses concentrations demeurent en dessous de la concentration sans effet observé chronique; le document d'orientation de l'OCDE préconise un maximum de 100 µL/L, cependant un rapport récent ramène cette recommandation à une concentration de solvant dans l'eau de dilution limitée à 20 µL/L seulement (12). De plus, en cas de recours à un solvant comme véhicule, des témoins appropriés pour le solvant sont analysés en plus des témoins sans solvant (eau pure). Lorsque l'introduction du produit chimique se révèle impossible *via* l'eau, que ce soit en raison de ses caractéristiques physico-chimiques (faible solubilité) ou de sa disponibilité limitée, l'administration par le biais de l'alimentation peut être envisagée. Quelques travaux préliminaires ont été menés pour ce qui relève de l'exposition par la nourriture, cependant cette méthode demeure marginale. Le choix du procédé s'appuie sur une documentation solide et fait l'objet de vérification par l'analyse.

Sélection des concentrations d'essai

Établissement de la concentration d'essai maximale

16. Dans le cadre de l'essai, la concentration maximale correspond: soit à la limite de solubilité de la substance en question: soit à la concentration maximale tolérée (CMT) pour les produits chimiques présentant une toxicité aiguë, soit à 100 mg/L, la concentration résultante la plus basse étant retenue.

17. La CMT est définie comme la concentration de la substance d'essai la plus élevée entraînant moins de 10 % de mortalité aiguë. Pour recourir à cette approche, des données empiriques relatives à la mortalité aiguë permettant d'estimer la valeur de la CMT sont nécessaires. La détermination de la CMT peut s'avérer inexacte, et requiert donc généralement un avis professionnel. Si les modèles de régression constituent les outils les plus solides techniquement pour estimer la CMT, il est néanmoins possible d'en obtenir une approximation utile en divisant par trois les données existantes de toxicité aiguë exprimée par la CL_{50} . Les données de toxicité aiguë peuvent cependant manquer pour les espèces employées dans l'essai. Si ces valeurs ne sont pas disponibles pour ces espèces, un essai de CL_{50} peut être effectué sur 96 h avec des têtards représentatifs (c'est-à-dire au même stade de développement) de la population soumise à l'EMA. Il est également possible, lorsque des données sur d'autres espèces aquatiques sont disponibles (par exemple des études de CL_{50} chez les poissons ou chez d'autres amphibiens), de faire appel à l'avis d'un professionnel qui fournira une estimation de la CMT probable, au moyen d'une extrapolation interespèces.

18. Si le produit chimique ne présente pas de toxicité aiguë et demeure soluble à plus de 100 mg/L, une autre solution consiste à choisir cette valeur comme concentration d'essai maximale (CEM), puisque cette dernière est habituellement considérée comme « pratiquement non toxique ».

19. Par ailleurs, et bien qu'il ne s'agisse pas de la procédure recommandée, des méthodes de renouvellement statique peuvent être mises en œuvre quand les méthodes par écoulement continu ne permettent pas d'atteindre la CMT. Si ces méthodes de renouvellement statiques sont employées, la stabilité de la concentration de la substance d'essai est alors consignée, et reste dans les limites des critères de performances de l'essai. Des périodes de renouvellement de 24 h sont conseillées. En revanche, les périodes de renouvellement dépassant les 72 h ne sont pas acceptables. Les autres paramètres caractérisant la qualité de l'eau (notamment OD, température, pH, etc.) sont en outre mesurés à l'issue de chaque période, juste avant le renouvellement.

Fourchette de concentrations de l'essai

20. Le *minimum* requis comprend trois concentrations d'essai et un témoin d'eau pure (plus un véhicule témoin, le cas échéant). Le différentiel entre la plus élevée et la plus basse des concentrations d'essai minimale observées est d'environ une unité d'ordre de grandeur. La distance entre deux doses correspond au maximum à un facteur de 0.1 et au minimum de 0.33.

PROCÉDURE

Lancement et conduite de l'essai

Jour 0

21. L'exposition débute lorsqu'un nombre suffisant de têtards de la population d'élevage en pré-exposition ont atteint le stade de développement 51, d'après Nieuwkoop et Faber (8), et que leur âge post-fertilisation est inférieur ou égal à 17 jours. Pour sélectionner les individus destinés à l'essai, les têtards d'aspect sain et normal sont isolés du reste de la lignée et placés dans un même récipient contenant un volume adapté d'eau de dilution. La détermination du stade de développement est effectuée en retirant un à

un les têtards du vivier commun à l'aide d'un petit filet ou d'une passoire pour les transférer dans une chambre de mesure transparente (p. ex. une boîte de Petri de 100 mm) remplie d'eau de dilution. S'il est préférable de ne pas recourir à l'anesthésie pendant la détermination du stade de développement, on peut toutefois anesthésier les têtards individuellement avant manipulation avec 100 mg/L de méthanesulfonate de tricaine (p. ex. MS-222), convenablement tamponné au bicarbonate de sodium (pH 7.0). Si le choix de l'anesthésie est retenu, il convient de recueillir la méthodologie appropriée pour utiliser le MS-222, par exemple, auprès de laboratoires expérimentés, et de la rapporter avec les résultats de l'essai. Les animaux sont traités avec soin durant le transfert afin de minimiser le stress dû à la manipulation et d'éviter toute blessure.

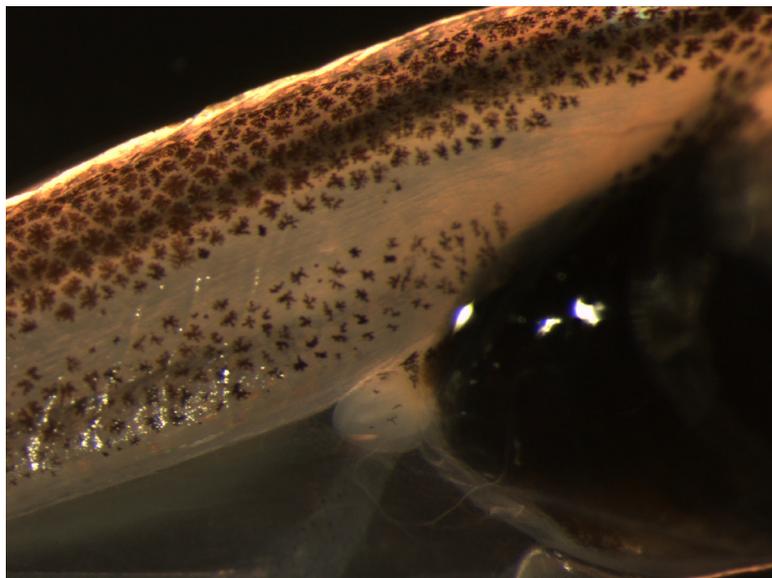
22. Le stade de développement des individus est évalué au moyen d'un microscope binoculaire à dissection. Pour réduire la variabilité maximale du stade de développement, il est important de mener cet examen le plus précisément possible. D'après Nieuwkoop et Faber (8), le premier repère de développement permettant de sélectionner les larves ayant atteint le stade 51 est constitué par la morphologie des pattes postérieures. Les caractéristiques morphologiques des membres postérieurs sont donc à examiner au microscope. Le guide complet de Nieuwkoop et Faber (8) est consulté pour collecter les informations complètes sur la détermination du stade de développement des têtards, néanmoins, il est aussi possible de caractériser ce stade de manière fiable au moyen de critères morphologiques apparents. Le tableau suivant est un outil permettant de simplifier et rationaliser le procédé de détermination du stade de développement tout au long de l'étude, en identifiant les critères morphologiques apparents associés aux différents stades dans l'hypothèse d'un développement normal.

Tableau 2. Critères morphologiques apparents pour la détermination du stade de développement d'après les recommandations de Nieuwkoop et Faber

Critères morphologiques apparents	Stade de développement															
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
Pattes postérieures	X	X	X	X	X	X	X									
Pattes antérieures						X	X	X	X	X						
Structure crâniofaciale										X	X	X	X			
Morphologie du nerf olfactif											X	X	X			
Longueur de la queue													X	X	X	X

23. L'essai n'est lancé que lorsque tous les têtards ont atteint le stade 51. Le principal critère morphologique apparent pour la détermination du stade de développement est la morphologie des pattes postérieures, comme cela est démontré dans le Graphique 1.

Graphique 1. Morphologie des pattes postérieures d'un têtard de *X. laevis* au stade 51.



24. En plus de la sélection en fonction du stade de développement, il est également possible d'effectuer une sélection des animaux destinés à l'expérimentation en fonction de leur taille. À cette fin, la longueur totale du corps (différente de la longueur museau-cloaque - LMC) est relevée au jour 0 chez un sous-échantillon d'environ 20 têtards au stade NF 51. Une fois que la moyenne de la longueur totale du corps a été calculée pour ce groupe d'individus, les valeurs limites minimum et maximum de cette longueur pour les individus admis dans l'essai sont fixées respectivement en soustrayant et en ajoutant 3 mm à la moyenne établie précédemment (les valeurs moyennes de la longueur totale du corps sont comprises entre 24.0 et 28.1 mm chez les têtards de stade 51). La détermination du stade de développement demeure néanmoins le principal paramètre pour évaluer si un animal est prêt pour l'essai ou non. Les têtards présentant des malformations manifestes ou des blessures sont exclus de l'essai.

25. Les individus répondant aux critères liés au stade décrits précédemment sont mis de côté dans un vivier rempli avec l'eau d'élevage pure, jusqu'à la fin du processus de détermination du stade de développement. Une fois que cette étape est terminée, les larves sont réparties aléatoirement dans les viviers destinés au traitement d'exposition, jusqu'à ce que chacun d'eux compte 20 animaux. Chacun de ces viviers fait alors l'objet d'une inspection afin de détecter les individus d'apparence anormale, présentant notamment des blessures, une nage inhabituelle, etc. Quand leur aspect n'est absolument pas sain, les têtards sont retirés des viviers de traitement et remplacés par les larves nouvellement sélectionnées dans le vivier commun.

Observations

26. Des informations plus approfondies sur les procédures de clôture de l'essai et le traitement des têtards sont disponibles dans le document d'orientation de l'OCDE intitulé *Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology* (9).

Mesures au jour 7

27. Au jour 7, cinq têtards par répliquat sont prélevés au hasard dans chaque vivier d'essai. La procédure aléatoire employée garantit une même probabilité d'être sélectionné à tous les individus. Pour cela, toute méthode de choix aléatoire est valable, mais tous les têtards sont capturés dans un filet. Les larves non retenues sont rendues à leur vivier d'origine, et les individus sélectionnés sont euthanasiés humainement en les plaçant dans 150 à 200 mg/L de MS-222, par exemple, convenablement tamponné à

pH 7.0 avec du bicarbonate de sodium. Les têtards euthanasiés sont rincés à l'eau, séchés, puis pesés au milligramme près. La longueur des pattes postérieures, la longueur museau-cloaque et le stade de développement (évalués à l'aide d'un microscope binoculaire à dissection) sont déterminés pour chaque larve.

Mesures au jour 21 (clôture de l'essai)

28. À la fin de l'essai (jour 21), les têtards restants sont euthanasiés humainement en les plaçant dans 150 à 200 mg/L de MS-222, par exemple, convenablement tamponné avec du bicarbonate de sodium, comme précédemment. Ils sont alors rincés à l'eau, séchés, puis pesés au milligramme près. Le stade de développement, la LMC et la longueur des pattes postérieures sont déterminés pour chaque têtard.

29. Les larves sont ensuite toutes placées dans le fixateur de Davidson durant 48 à 72 h, soit comme échantillon de corps entier, soit en ne conservant que les tissus de la tête, y compris la mandibule, pour les évaluations histologiques. Pour l'histopathologie, l'échantillonnage exige un total de cinq têtards par vivier répliqué. La hauteur des cellules folliculaires dépendant du stade de développement (10), l'approche la mieux adaptée pour l'échantillonnage consiste à sélectionner les individus ayant atteint le même stade, autant que possible. Pour choisir des têtards de même stade de développement, il faut que ce stade soit connu chez tous les animaux avant la sélection et le traitement des données collectées et conservées. Il est nécessaire d'achever cette détermination des stades de développement car des différences de développement normales se traduisent par des différentiels dans la distribution des divers stades au sein de chaque vivier répliqué.

30. Les animaux sélectionnés pour l'histopathologie ($n = 5$ pour chaque répliquat) correspondent au stade médian observé chez les témoins (répliquats regroupés), autant que possible. S'il se trouve des viviers répliqués comptant plus de cinq larves au stade approprié, cinq individus sont alors sélectionnés au hasard.

31. À l'inverse, si certains viviers répliqués contiennent moins de cinq animaux au stade approprié, des individus sont choisis de manière aléatoire au sein de la population de stade immédiatement inférieur ou supérieur pour rejoindre le groupe échantillon, jusqu'à ce que cet ensemble compte cinq larves par répliquat. Idéalement, le choix de prélever des larves au sein de la population de stade immédiatement inférieur ou supérieur pour compléter l'échantillon est étayé par l'évaluation globale de la distribution des stades de développement dans les populations témoins et soumises aux traitements chimiques. Ainsi, si l'exposition chimique entraîne un retard de développement, les larves complémentaires sont alors prélevées dans la population présentant le stade immédiatement inférieur. Inversement, si l'exposition chimique entraîne une accélération du développement, les larves complémentaires sont prélevées dans la population présentant le stade immédiatement supérieur.

32. En cas de perturbation sévère du développement des têtards en raison du traitement avec la substance d'essai, la distribution des stades observés dans la population exposée chimiquement est susceptible de ne pas correspondre à la médiane des stades de développement calculée pour les témoins. Dans ces cas uniquement, le processus de sélection est modifié et se fonde sur un stade différent de la médiane des stades de développement observés pour les témoins, afin d'obtenir un échantillon de larves destinées à l'histologie de la thyroïde cohérent en termes de stade. En outre, si les stades demeurent indéterminés (dans les cas d'asynchronie), il convient de choisir au hasard cinq têtards dans chaque répliquat, pour les analyses histologiques. Les raisons motivant l'intégration dans l'échantillon de toute larve présentant un stade de développement différent de la valeur médiane chez les témoins sont rapportées.

Détermination des observations et effets biologiques

33. Pendant la phase d'exposition de 21 jours, le relevé des principales observations rapportées a lieu aux jours 7 et 21, néanmoins une observation quotidienne de la population étudiée est nécessaire. Le Tableau 3 présente un aperçu de l'ensemble des observations rapportées et le moment où elles sont relevées. Des informations plus détaillées concernant les techniques relatives au relevé des observations biologiques et aux évaluations histologiques sont disponibles dans le document d'orientation de l'OCDE (9).

Tableau 3. Date et fréquence des observations rapportées au cours de l'EMA.

Observations rapportées	Quotidiennement	Jour 7	Jour 21
- Mortalité	•		
- Stade de développement		•	•
- Longueur des pattes postérieures		•	•
- Longueur museau-cloaque (LMC)		•	•
- Poids du corps humide		•	•
- Histologie de la glande thyroïde			•

Observations biologiques

34. Le stade de développement, la longueur des pattes postérieures, la LMC et le poids humide constituent les observations morphologiques de l'EMA; chacune de ces observations fait l'objet d'une discussion ci-après. Des informations techniques complémentaires sur la collecte de ces données, sont disponibles dans le document d'orientation de l'OCDE cité en référence, qui comprend entre autres les procédures d'analyse assistée par ordinateur recommandées.

Stade de développement

35. Le stade de développement des têtards de *X. laevis* est déterminé à l'aide des critères d'évaluation établis par Nieuwkoop et Faber (8). Les données relatives au stade de développement permettent de déceler si celui-ci est accéléré, asynchrone, retardé ou non affecté. Une accélération ou un retard de développement sont détectés en comparant les stades médians atteints chez les témoins et les groupes traités, respectivement. Une asynchronie est rapportée quand les tissus observés ne présentent aucune anomalie ou malformation, mais que le rythme de la morphogenèse ou le développement des différents tissus sont en décalage chez un même individu.

Longueur des pattes postérieures

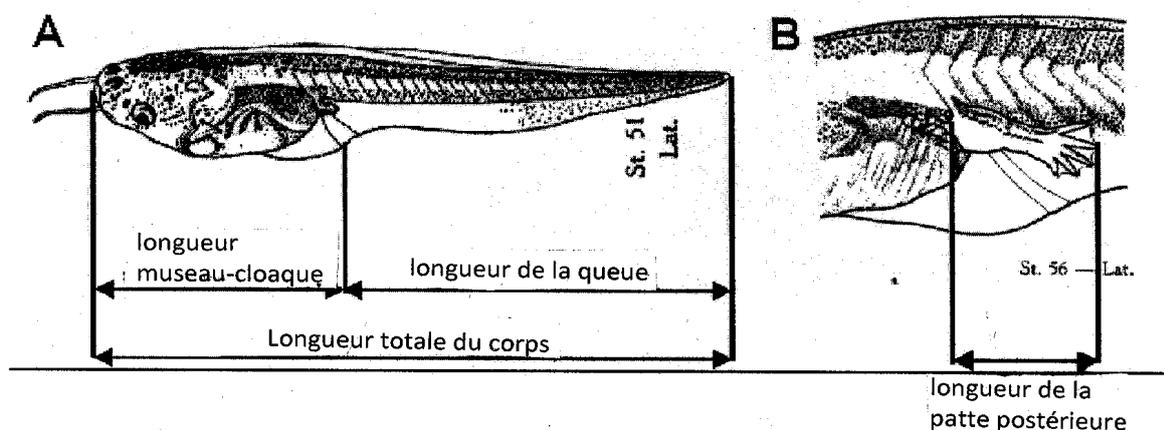
36. La différenciation et la croissance des pattes postérieures sont contrôlées par les hormones thyroïdiennes et constituent des critères de développement majeurs, déjà employés pour la détermination du stade. Le développement des pattes postérieures est employé comme donnée qualitative pour déterminer le stade de développement, cependant, dans le cas présent, il s'agit d'un paramètre d'évaluation quantitatif. Par voie de conséquence, la longueur des pattes postérieures est mesurée pour détecter des effets sur l'axe thyroïdien (graphique 2). Par souci de cohérence, cette longueur est mesurée sur la patte postérieure gauche. La longueur des pattes postérieures est relevée aux jours 7 et 21 de l'essai. Au jour 7, cette valeur est mesurée directement, comme l'illustre le graphique 2. En revanche, le relevé de la longueur des pattes postérieures au jour 21 est compliqué par les courbures du membre. Aussi les mesures au jour 21 doivent-elles être prises à partir de la paroi corporelle puis suivre la ligne médiane de la patte, en se pliant à toutes

les déviations angulaires. Des changements de longueur des pattes postérieures observés dès le jour 7, même s'ils ne sont pas évidents au jour 21, sont considérés comme des signes potentiels d'une activité sur la thyroïde. Les longueurs sont mesurées sur des photos numériques, au moyen de logiciels d'analyse d'image, procédé décrit dans le document d'orientation de l'OCDE intitulé *Guidance Document on Amphibian Thyroid Histopathology* (9).

Longueur et poids humide du corps

37. Le protocole d'essai comprend la caractérisation de la longueur museau-cloaque (LMC) (graphique 2) et du poids humide, en vue d'évaluer les effets potentiels des substances d'essai sur la vitesse de croissance des têtards, par comparaison avec un groupe témoin. Par ailleurs, ces valeurs sont utiles pour détecter la toxicité générale de la substance d'essai. Dans la mesure où l'élimination du film d'eau avant la pesée est susceptible de stresser les têtards et de leur infliger des blessures cutanées, de tels relevés sont limités à un sous-échantillon au jour 7, avant d'être effectués sur l'ensemble des animaux à la fin de l'essai (jour 21). À des fins de cohérence, il convient de considérer l'aspect crânien du cloaque comme la limite de la queue, pour la mesure.

38. La longueur museau-cloaque (LMC) sert à évaluer la croissance des têtards, comme l'illustre le graphique 2.



Graphique 2. (A) Types de mesures de la longueur du corps et de la (B) longueur des pattes postérieures chez les têtards de *X. laevis* (1).

Histologie de la glande thyroïde

39. Les observations du stade de développement et de la longueur des pattes postérieures sont importantes pour évaluer les changements du développement métamorphique liés à l'exposition, cependant, un retard de développement ne saurait être considéré en soi comme le signe d'une activité anti-thyroïdienne. Certaines modifications ne sont observables qu'au cours d'analyses histopathologiques de routine. Les critères de diagnostic comprennent l'hypertrophie/atrophie de la glande thyroïde, l'hypertrophie des cellules folliculaires, l'hyperplasie des cellules folliculaires, et, en tant que critères qualitatifs complémentaires : la superficie de la lumière folliculaire, la qualité des colloïdes ainsi que la taille/forme des cellules folliculaires. Le grade de sévérité attribué (sur 4 grades) est consigné. Des informations complémentaires sur l'obtention et le traitement des échantillons destinés à l'analyse

histologique, et sur la mise en œuvre de telles analyses sur les échantillons tissulaires sont disponibles dans les documents intitulés « Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 - Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation » et « Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 – Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas » (9). Les laboratoires menant cet essai pour la ou les premières fois sont invités à recueillir les conseils de pathologistes expérimentés pour se former, avant de s'engager dans l'analyse histologique et l'évaluation de la glande thyroïde. Les changements aussi importants que manifestes observés sur les paramètres morphologiques indiquant une accélération du développement ou une asynchronie peuvent dispenser du besoin d'effectuer des analyses histologiques sur les glandes thyroïdes. L'absence de modifications morphologiques évidentes ou de retard de développement attesté justifie toutefois le recours aux analyses histologiques.

Mortalité

40. L'ensemble des viviers est suivi quotidiennement pour détecter les têtards morts et contrôler le nombre de larves correspondant à chaque vivier. Il convient de consigner la date, la concentration et le numéro du vivier pour tout cas de mortalité. Les animaux morts sont retirés du vivier d'essai dès qu'ils sont identifiés. Les taux de mortalité supérieurs à 10 % sont des indicateurs potentiels de conditions d'essai mal adaptées, ou d'effets toxiques de la substance d'essai.

Observations complémentaires

41. L'observation d'un comportement anormal, de malformations très visibles et de lésions est consignée. Il convient de noter la date, la concentration et le numéro du vivier pour tout cas de comportement anormal, de malformations évidentes et de lésions. Un comportement normal se caractérise par la suspension des têtards dans la colonne d'eau, la queue élevée au-dessus de la tête, un battement léger de la queue sur un rythme régulier, des remontées à la surface, un opercule mobile, et la réponse au stimulus. Inversement, un comportement anormal implique notamment des animaux flottant à la surface, immobiles au fond du vivier, une nage inversée ou irrégulière, un manque d'activité à la surface, et l'absence de réponse au stimulus. En outre, les différences de consommation de nourriture entre les groupes de traitement sont consignées lorsqu'elles sont importantes. Les malformations apparentes et les lésions se manifestent éventuellement par des anomalies morphologiques (par exemple difformité des membres), des lésions hémorragiques et des infections bactériennes ou fongiques, entre autres. Ces déterminations sont d'ordre qualitatif, et sont considérées comme analogues aux signes cliniques de maladies/stress, et toujours en comparaison avec les animaux témoins. Une occurrence ou un taux d'occurrence supérieur dans les viviers exposés par rapport au groupe témoin constitue la preuve d'une toxicité manifeste.

DONNÉES ET RAPPORTS

Collecte des données

42. Toutes les données sont collectées à l'aide de systèmes électroniques ou manuels conformes aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL). Les données de l'étude comprennent :

Substance d'essai :

- Caractérisation de la substance d'essai: propriétés physico-chimiques; informations sur la stabilité et la biodégradabilité.
- Informations et données chimiques: méthode et fréquence de préparation des dilutions. Les informations sur les substances d'essai détaillent leurs concentrations réelle et nominale, et, dans certains cas, celles de produits chimiques qui ne sont pas la substance d'essai initiale, le cas

échéant. Les mesures sur la substance d'essai peuvent aussi bien concerner les solutions de réserve que les solutions d'essai.

- Solvant (s'il ne s'agit pas de l'eau pure): justification du choix et caractérisation de ce solvant (nature, concentration employée).

Conditions de l'essai:

- Registres opérationnels: ils compilent les observations relatives au fonctionnement du système d'essai ainsi qu'à l'environnement et aux infrastructures qui y participent. Habituellement, les registres comprennent: la température ambiante, la température d'essai, la période d'exposition lumineuse, l'état des éléments cruciaux du système d'exposition (notamment les pompes, les compteurs de cycles, les pressions), les débits, les niveaux d'eau, les renouvellements des bouteilles de réserve, et les rapports sur l'alimentation. Les paramètres généraux sur la qualité de l'eau incluent: le pH, l'oxygène dissous, la conductivité, l'iode total, l'alcalinité et la dureté.
- Déviations par rapport à la méthode d'essai: compile toutes les informations ou descriptions narratives des déviations consenties par rapport à la méthode d'essai.

Résultats:

- Observations et données biologiques: elles comprennent les observations quotidiennes sur la mortalité, la consommation de nourriture, les nages anormales, la léthargie, la perte d'équilibre, les malformations, les lésions etc. Les observations et données collectées à intervalle prédéterminé incluent: le stade de développement, la longueur des pattes postérieures, la longueur museau-cloaque et le poids humide.
- Techniques d'analyse statistique utilisées et justification de leur emploi; la présentation des résultats de cette analyse statistique sera de préférence sous forme de tableau.
- Données histologiques: elles incluent les descriptions narratives ainsi que le degré de sévérité et le taux d'incidence des observations spécifiques, conformément au document d'orientation sur l'histopathologie.
- Observations *ad hoc*: ces observations concernent toute description narrative de l'étude ne correspondant pas aux catégories décrites précédemment.

Rapports de données

43. L'annexe 2 propose des feuilles de calcul relatives au relevé quotidien des données, qui constituent une aide utile pour entrer les valeurs et calculer les statistiques globales. De plus, des tableaux de rapport sont fournis, ce qui facilite la communication des récapitulatifs des données concernant les effets mesurés. Les tableaux de rapport pour l'évaluation histologique sont disponibles dans l'annexe 2.

Critères de performance et acceptabilité/validité de l'essai

44. En général, des déviations importantes par rapport à de la méthode d'essai se traduisent par des données qui ne sont pas acceptables pour être interprétées et faire l'objet de rapports. Aussi les critères suivants, détaillés dans le [tableau 4](#), ont-ils été développés en vue d'orienter la détermination de la qualité de l'essai effectué et la performance générale des individus témoins.

Tableau 4. Critères de performance pour l'EMA.

Critères	Limites acceptables
Concentrations d'essai	Maintenues ≤ 20 % CV (variabilité de la concentration d'essai mesurée) sur les 21 jours de l'essai
Mortalité chez les témoins	≤ 10 % – la mortalité dans chaque répliquat des témoins ne dépasse pas 2 têtards
Stade de développement médian chez les témoins à la fin de l'essai	57
Répartition du stade de développement dans le groupe témoin	Les individus correspondant respectivement à 10 % et à 90 % de la distribution du stade de développement ne présentent pas une différence de plus de 4 stades.
Oxygène dissous	≥ 40 % de la saturation de l'air*
pH	Le pH demeure entre 6.5 et 8.5. Les différentiels interrépliquat et intertraitement n'excèdent pas 0.5.
Température de l'eau	22 ± 1 °C – Les différentiels interrépliquat et intertraitement n'excèdent pas 0.5 °C.
Concentrations d'essai hors toxicité manifeste	≥ 2
Performance des répliquats	≤ 2 répliquats sur l'ensemble de l'essai peuvent être compromis
Conditions particulières pour l'utilisation d'un solvant	Si un solvant est utilisé comme véhicule, il convient de mettre en place un témoin pour le solvant et pour l'eau, et les résultats correspondants sont consignés.
	Les différences statistiquement significatives entre les groupes témoins pour le solvant et pour l'eau sont traitées de manière particulière. Voir ci-dessous pour plus d'informations
Conditions particulières pour le recours à un système de renouvellement statique	Les analyses chimiques représentatives effectuées avant et après le renouvellement sont rapportées.
	La teneur en ammoniacque est calculée juste avant le renouvellement.
	Tous les paramètres liés à la qualité de l'eau récapitulés dans le Tableau 1 de l'annexe 1 sont évalués juste avant le renouvellement.
	La période entre deux renouvellements ne dépasse pas 72 h.
	Un calendrier d'alimentation adapté (50 % de la ration alimentaire quotidienne de Sera Micron®)

*L'aération de l'eau peut être maintenue au moyen de bulleurs. Il est conseillé de placer les bulleurs à des endroits où ils n'entraînent pas de stress excessif chez les têtards.

Validité de l'essai

45. Pour être jugé acceptable/valide, un essai satisfait les exigences suivantes :

- Validité d'une expérience menée dans le cadre de l'essai, pour conclure à une substance négative en termes d'activité sur la thyroïde :
 1. Pour tous les traitements considérés (y compris les témoins), la mortalité n'excède pas 10 %. Pour un répliquat donné, la mortalité ne dépasse pas trois têtards ; dans le cas contraire, le répliquat est jugé compromis.
 2. Au moins deux niveaux de traitement dont les quatre répliquats demeurent non compromis sont nécessaires pour effectuer les analyses.

3. Au moins deux niveaux de traitement exempts de toxicité manifeste sont nécessaires pour effectuer les analyses.

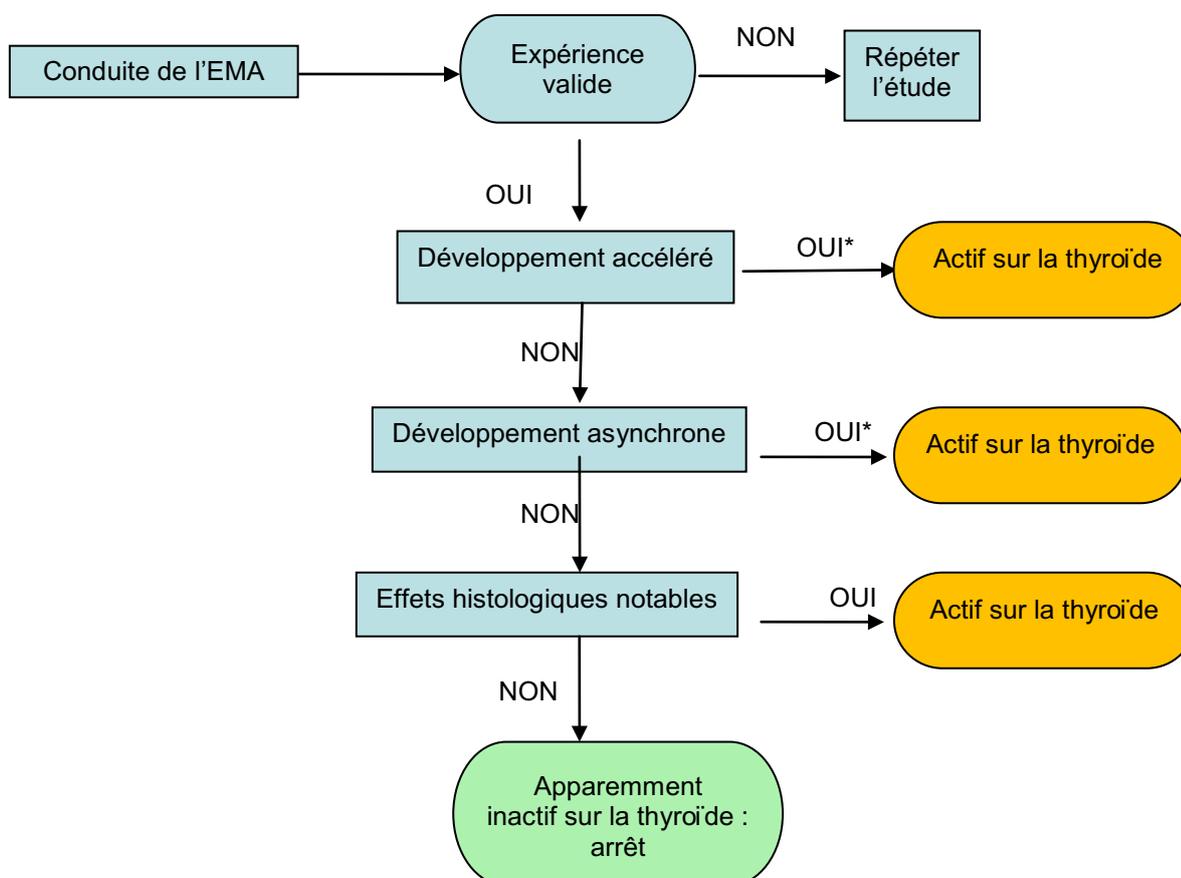
- Validité d'une expérience menée dans le cadre de l'essai, pour conclure à une substance positive en termes d'activité sur la thyroïde :

1. La mortalité observée est limitée à deux têtards par répliquat dans le groupe témoin, au maximum.

Diagramme de décision dans la conduite de l'EMA

46. Un diagramme de décision a été créé pour l'EMA afin d'offrir une assistance logique dans la conduite et l'interprétation des résultats du bioessai (voir le diagramme de décision dans le [gGraphique 3](#)). Ce diagramme de décision accorde, par essence, une forte pondération aux observations relevées que sont le développement accéléré, asynchrone, ou l'histopathologie thyroïdienne, tandis que les autres observations susceptibles d'être également affectées par la toxicité générale, comme le retard de développement, la longueur museau-cloaque et le poids du corps humide sont caractérisés par une pondération moindre.

Graphique 3. Diagramme de décision dans la conduite de l'EMA



*Certaines autorités réglementaires peuvent réclamer une histologie, malgré l'observation de différences importantes dans le développement accéléré et asynchrone. L'organisme en charge de l'essai est invité à consulter les autorités compétentes avant le début des expériences, afin de déterminer les relevés d'observation requis.

Développement accéléré (évalué avec le stade de développement, la LMC et la longueur des pattes postérieures)

47. On sait que le développement accéléré est dû uniquement aux effets liés aux hormones thyroïdiennes. Parmi ces effets figurent ceux qui affectent les tissus périphériques, notamment dus à l'interaction directe avec les récepteurs des hormones thyroïdiennes (par exemple T4), ou ceux qui entraînent une altération des concentrations d'hormones thyroïdiennes en circulation. Chacun de ces cas est jugé suffisant pour conclure à une activité de la substance sur la thyroïde. Le développement accéléré est évalué de l'une ou l'autre manière suivante : soit le stade de développement général est déterminé en se basant sur l'approche standard détaillée par Nieuwkoop et Faber (8), soit les caractères morphologiques spécifiques peuvent être quantifiés, par exemple la longueur des pattes postérieures, aux jours 7 et 21, car ce critère réagit positivement aux activités agonistes sur les récepteurs des hormones thyroïdiennes. Si les statistiques dégagent une accélération significative du développement ou de la croissance des pattes postérieures, l'essai indique que la substance présente une activité sur la thyroïde.

48. L'évaluation d'un éventuel développement accéléré chez les animaux de l'essai par rapport à la population témoin se fonde sur les résultats des analyses statistiques menées sur les quatre relevés d'observations suivants:

- longueur des pattes postérieures (normalisée par la LMC) au jour 7 de l'étude
- longueur des pattes postérieures (normalisée par la LMC) au jour 21 de l'étude
- stade de développement au jour 7 de l'étude
- stade de développement au jour 21 de l'étude

49. Les analyses statistiques portant sur la longueur des pattes postérieures exploitent les données relevées pour le membre postérieur gauche. La normalisation de la longueur des pattes postérieures se fait en calculant le rapport entre cette longueur et la longueur museau-cloaque pour chaque individu. Les moyennes des valeurs normalisées sont alors comparées. L'accélération du développement est alors signalée par une forte hausse de la moyenne des longueurs des pattes postérieures (normalisées) mesurées dans le groupe traité chimiquement, par rapport à celle du groupe témoin, au jour 7 et/ou 21 de l'étude (voir annexe 3).

50. Les analyses statistiques du stade de développement sont effectuées avec les stades évalués conformément aux critères morphologiques décrits par Nieuwkoop et Faber (8). L'accélération du développement est caractérisée quand les analyses multi-quantiques détectent une forte hausse des valeurs du stade de développement dans le groupe traité chimiquement, par rapport à celles du groupe témoin, au jour 7 et/ou 21 de l'étude.

51. Dans la méthode de l'essai de métamorphose des amphibiens, un effet significatif observé sur l'un quelconque des quatre relevés d'observations mentionnés ci-dessus est considéré comme suffisant pour conclure à un développement accéléré. Ainsi, des effets significatifs sur la longueur des pattes postérieures relevés à un moment donné n'ont pas besoin d'être confirmés: ils n'impliquent pas nécessairement que la même tendance soit attestée lors de l'observation suivante, ni que le stade de développement soit affecté de la même manière, au même moment. De la même manière, les effets significatifs sur le stade de développement relevés à un moment donné n'ont pas besoin d'être confirmés: ils n'impliquent pas nécessairement que la même tendance soit attestée lors de l'autre observation, ni que la longueur des pattes

postérieures soit affectée de la même manière, au même moment. Néanmoins, si des effets significatifs touchent plusieurs des observations rapportées, ils renforcent les preuves en faveur d'un développement accéléré.

Développement asynchrone (évalué avec le stade de développement)

52. Un développement asynchrone se caractérise par un décalage dans le rythme de morphogenèse ou de développement des différents tissus chez un même têtard. L'impossibilité d'établir clairement le stade de développement d'un individu en se basant sur la série d'observations morphologiques considérées comme typiques d'un stade donné indique que les tissus se développent de manière asynchrone, à travers la métamorphose. Un développement asynchrone est un signe d'activité sur la thyroïde. Les seuls modes d'action connus entraînant une telle asynchronie sont fondés sur les effets de produits chimiques sur l'action périphériques et/ou le métabolisme associés aux hormones thyroïdiennes dans les tissus en développement, comme on l'observe avec les inhibiteurs de la déiodinase.

53. L'évaluation du développement asynchrone chez les animaux inclus dans l'essai par rapport au groupe témoin s'appuie sur les examens morphologiques d'ensemble effectués sur les larves aux jours 7 et 21.

54. La description du développement normal des xénopes par Nieuwkoop et Faber (8) constitue le cadre permettant d'identifier l'ordre séquentiel du remodelage des tissus attendu. Le terme « développement asynchrone » se rapporte spécifiquement aux déviations dans le développement morphologique général des têtards empêchant la détermination du stade de développement conformément aux références de Nieuwkoop et Faber (8), parce que les relevés morphologiques clés indiquent des stades différents.

55. Comme le suppose le terme « développement asynchrone », seuls les cas présentant des déviations de la progression du remodelage de tissus spécifiques par rapport au remodelage d'autres tissus sont pris en considération. Parmi les phénotypes classiques figurent le retard ou l'absence d'apparition des pattes antérieures, tandis que les tissus des pattes postérieures et de la queue se développent normalement ou de manière avancée, ou la résorption précoce des branchies par rapport au stade de morphogenèse des membres postérieurs et à la résorption de la queue. Un animal sera enregistré comme présentant un développement asynchrone s'il n'est pas possible de lui attribuer un stade dans la mesure où il ne répond pas à la majorité des critères de Nieuwkoop et Faber correspondants (8), ou si une ou plusieurs caractéristiques clés se montrent très retardées ou accélérées (par exemple queue complètement résorbée alors que les pattes antérieures ne sont pas apparues). Cette évaluation est d'ordre qualitatif, et intègre l'intégralité des caractéristiques répertoriées par Nieuwkoop et Faber (8). Il n'est toutefois pas nécessaire de consigner l'état de développement de chacun de ces critères caractéristiques chez les animaux observés. Les individus chez lesquels un développement asynchrone est diagnostiqué ne se voient pas attribuer de stade de développement au sens de Nieuwkoop et Faber (8).

56. Ainsi, un des critères principaux pour désigner les anomalies du développement morphologique comme « développement asynchrone » réside dans le décalage entre le rythme relatif au remodelage et à la morphogenèse des tissus, tandis que la morphologie des tissus affectés ne présente pas d'anomalies évidentes. À titre d'exemple de cette interprétation des anomalies morphologiques importantes, un retard dans la morphogenèse des pattes postérieures par rapport au développement des autres tissus suffira à conclure à un « développement asynchrone », contrairement aux cas d'absence de ces membres postérieurs, d'anomalies digitales (par exemple ectrodactylie, polydactylie) ou autres malformations des pattes évidentes.

57. Dans ce contexte, les principaux critères morphologiques à évaluer en termes d'avancée coordonnée de la métamorphose comprennent la morphogenèse des pattes postérieures et antérieures,

l'apparition des pattes antérieures, le stade de résorption de la queue (en particulier la résorption de la nageoire caudale) et la morphologie de la tête (par exemple la taille des branchies et le stade où elles se résorbent, la morphologie de la mandibule, ou la protrusion du cartilage de Meckel).

58. Selon le mécanisme d'action de la substance chimique, différents phénotypes morphologiques importants sont susceptibles d'apparaître. Parmi les phénotypes classiques, on compte le retard ou l'absence d'apparition des pattes antérieures, malgré un développement normal voire accéléré des membres postérieurs et des tissus de la queue, ainsi que la résorption précoce des branchies par rapport aux pattes postérieures et au remodelage de la queue.

Histopathologie

59. Si le produit chimique ne présente pas de toxicité manifeste et n'entraîne pas d'accélération ou d'asynchronie du développement, l'histopathologie de la glande thyroïde est alors étudiée, à l'aide du document d'orientation approprié (9). En l'absence de toxicité, le retard de développement est un indicateur fort d'activité anti-thyroïdienne. Cependant, l'étude du stade de développement est moins sensible et permet moins d'établir un diagnostic que les analyses histopathologiques de la glande thyroïde. Dans ce cas, ces analyses sont donc requises. Des effets sur l'histologie des glandes thyroïdes ont été démontrés, même lorsque le développement demeure normal. Si des changements sur l'histopathologie de la thyroïde sont observés, la substance chimique est alors considérée comme présentant une activité sur la thyroïde. Inversement, si les glandes thyroïdes ne souffrent d'aucune lésion histologique et qu'il n'y a pas de retard de développement, le produit chimique est considéré comme inactif sur la thyroïde. La raison de cette distinction repose sur le fait que la thyroïde est sous l'influence de la HST (*hormone de stimulation thyroïdienne*), si bien que toute substance chimique altérant suffisamment la circulation des hormones thyroïdiennes pour affecter la sécrétion de HST entraîne alors des modifications histopathologiques dans les glandes thyroïdes. Divers mécanismes et modes d'action sont susceptibles de réduire la circulation des hormones thyroïdiennes. Ainsi, même si la concentration des hormones thyroïdiennes représente une indication de l'effet sur la thyroïde, cet élément ne suffit pas à préciser le mécanisme ou le mode d'action associé à la réponse.

60. Ces effets mesurés sur la glande thyroïde ne se prêtant pas aux approches statistiques de base, la détermination d'un effet consécutif à une exposition chimique s'appuie sur l'expertise d'un pathologiste.

Retard de développement (évalué avec le stade de développement, la longueur des pattes postérieures, le poids corporel et la LMC)

61. Des retards de développement peuvent apparaître du fait de mécanismes anti-thyroïdiens ou d'une toxicité indirecte. De légers retards de développement associés à des signes importants de toxicité indiquent probablement un effet toxique non spécifique. L'évaluation de la toxicité non liée à la thyroïde constitue un élément primordial de l'essai, afin de diminuer la probabilité d'apparition de faux positifs. Une mortalité excessive est un signe évident que d'autres mécanismes toxiques entrent en jeu. De la même manière, de légers retards de croissance, évalués au moyen du poids humide et/ou de la LMC, suggèrent également une toxicité non liée à la thyroïde. Une augmentation apparente de la croissance est souvent observée avec les composés qui perturbent le développement normal. La présence d'animaux plus développés n'indique donc pas nécessairement une toxicité non thyroïdienne. En revanche, la croissance n'est pas le seul élément étayant la détermination de la toxicité sur la thyroïde. Elle est plutôt associée au stade de développement et à l'histopathologie de la thyroïde afin de juger de l'activité sur la thyroïde. D'autres observations sont prises en compte pour déterminer la toxicité manifeste, y compris les œdèmes, les lésions hémorragiques, la léthargie, une baisse de la consommation de nourriture, une nage erratique/altérée, etc. Si une toxicité manifeste se déclare pour toutes les concentrations testées, il convient

de réévaluer la substance d'essai dans une fourchette de concentrations plus basse avant de conclure à une éventuelle activité sur la thyroïde.

62. En l'absence de signes de toxicité manifeste, les retards de développement statistiquement significatifs indiquent que le produit chimique est actif sur la thyroïde (par un mécanisme antagoniste). En outre, s'il n'existe pas de réponse statistiquement marquée, cette observation peut être complétée par les résultats de l'histopathologie de la thyroïde.

Analyses statistiques

63. Il est préférable d'effectuer ces analyses statistiques en suivant les procédures décrites dans le document intitulé *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application* (11). En ce qui concerne l'ensemble des paramètres d'évaluation quantitatifs et continus (longueur des pattes postérieures, LMC, poids humide) correspondant à une fonction dose-réponse monotone, il convient d'appliquer le test de Jonckheere - Terpstra par méthode descendante afin de dégager un effet significatif du traitement.

64. Pour les paramètres d'évaluation continus ne correspondant pas à une fonction dose-réponse monotone, les données sont examinées en termes de normalité (de préférence avec les tests de Shapiro - Wilk ou d'Anderson - Darling) et d'homogénéité de la variance (en priorité avec le test de Levene). Les deux tests utilisent les données résiduelles d'une ANOVA. S'il est possible de substituer les jugements d'un expert à ces tests formels de normalité et d'homogénéité de la variance, ces derniers demeurent toutefois préférables. En cas de non-normalité ou d'hétérogénéité de la variance, une transformation visant à normaliser les données et stabiliser la variance est recherchée. Si les valeurs (éventuellement après transformation) présentent une distribution normale avec une variance homogène, le test de Dunnett permet de dégager les effets significatifs du traitement. Si les valeurs (éventuellement après transformation) présentent une distribution normale avec une variance hétérogène, les effets significatifs du traitement sont déterminés grâce au test de Tamhane - Dunnett, ou au test T3, ou encore avec le test U de Mann - Whitney - Wilcoxon. Dans le cas où aucune transformation visant à normaliser les données n'a été trouvée, les effets significatifs du traitement sont déterminés avec le test U de Mann - Whitney - Wilcoxon après corrections des p-valeurs selon la méthode Bonferroni - Holm. Le test de Dunnett s'applique indépendamment du test F de l'ANOVA, et le test Mann - Whitney est indépendant de tout test de Kruskal - Wallis global.

65. Aucune mortalité significative n'est attendue, néanmoins il convient de l'évaluer par méthode descendante avec le test de Cochran - Armitage lorsque les données se traduisent par une fonction dose-réponse monotone ; dans les autres cas, c'est le test exact de Fisher avec correction de Bonferroni - Holm qui est appliqué.

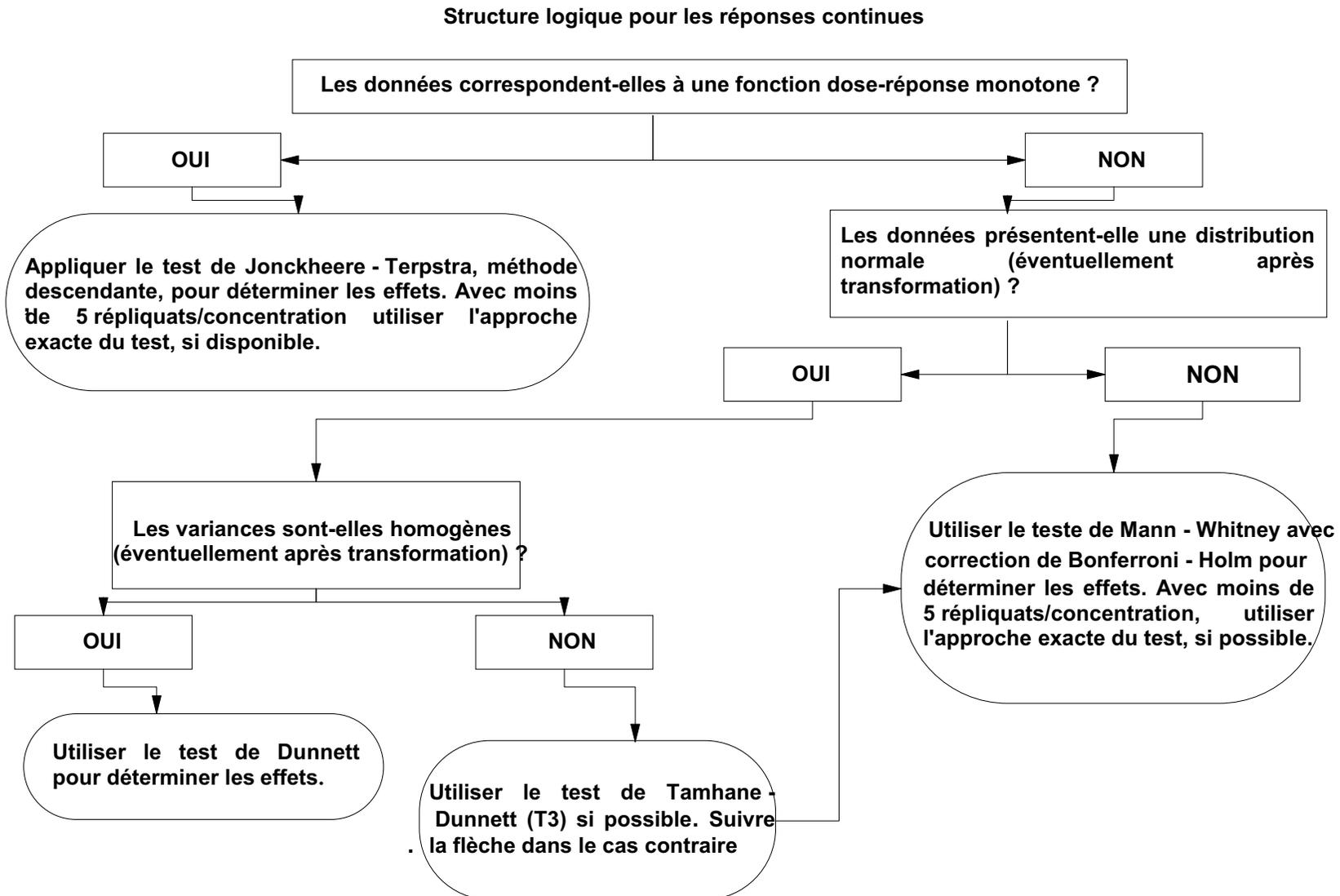
66. Un éventuel effet significatif du traitement sur le stade de développement est évalué par méthode descendante au moyen du test de Jonckheere - Terpstra sur les médianes des répliquats. Une autre technique pour dégager un tel effet consiste à recourir à des analyses multi-quantiques avec le test de Jonckheere en se basant sur les résultats compris entre les 20^e et 80^e percentiles ; comme cette méthode prend en compte des changements dans le profil de distribution, elle est préférable aux autres.

67. L'unité d'analyse correcte est le répliquat : ainsi, le test de Jonckheere - Terpstra ou le test U de Mann - Whitney exploitent les médianes des répliquats, tandis que le test de Dunnett analyse les moyennes des répliquats. Il est possible d'évaluer visuellement le caractère monotone de la fonction dose-réponse en examinant les moyennes ou médianes des répliquats et des traitements, ou bien par le biais de tests formels tels que ceux décrits précédemment (11). Si le nombre de répliquats par traitement ou pour les témoins est inférieur à cinq, il convient d'employer une approche fondée sur des permutations exactes, des tests de

Jonckheere - Terpstra et Mann - Whitney, dans la mesure du possible. Pour tous les tests cités, on conclut à la significativité statistique au-dessus de 0.05.

68. Le graphique 4 présente la structure logique d'exécution des tests statistiques sur les données continues.

Graphique 4. Structure logique de l'approche statistique pour le traitement des données de réponse continues.



Considérations particulières pour l'analyse des données

Utilisation des traitements compromis

69. Plusieurs facteurs entrent en jeu pour déterminer si un répliquat ou l'intégralité d'un traitement présentent une toxicité manifeste et s'il convient alors de les exclure de l'analyse. Une toxicité manifeste se caractérise par une mortalité supérieure à deux individus dans un répliquat, mortalité qui ne saurait être imputable à une erreur technique, et s'explique donc par la toxicité. Parmi les signes supplémentaires de toxicité manifeste figurent l'hémorragie, les comportements anormaux, les nages anormales, l'anorexie ainsi que tout autre signe clinique de maladie. Des évaluations qualitatives s'avèrent parfois nécessaires pour les signes de toxicité sous-létale, toujours par rapport au groupe témoin dans l'eau pure.

Témoins associés au solvant

70. Un solvant n'est employé qu'en dernier ressort, après avoir considéré toutes les autres solutions de transport du produit chimique. Si l'option du solvant est néanmoins retenue, il est impératif de mettre en place conjointement un témoin constitué d'eau pure. À la clôture de l'essai, les effets potentiels du solvant font l'objet d'une évaluation. Pour cela, les résultats correspondant au groupe témoin du solvant sont comparés à ceux du groupe témoin de l'eau pure. Les relevés d'observation les plus pertinents dans ce cadre sont le stade de développement, la LMC et le poids humide, puisque ces relevés sont sensibles aux toxicités non thyroïdiennes. Si des différences statistiquement significatives entre les groupes témoins solvant et eau pure se dégagent sur ces relevés, il convient de déterminer les effets correspondants aux relevés d'observation en se fondant sur les observations relevées chez les témoins dans l'eau pure. Si, à l'inverse, il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les deux groupes pour l'ensemble des observations relevées, les effets se fondent sur les observations relevées à la fois chez les témoins correspondant à l'eau de dilution et au solvant.

Groupes de traitement atteignant un stade de développement supérieur ou égal à 60

71. Au-delà du stade 60, le poids et la taille des têtards diminuent du fait de la résorption des tissus et de la baisse de leur masse d'eau en valeur absolue. Aussi les mesures du poids humide et de la LMC ne sont-elles plus appropriées aux analyses statistiques des différences de vitesse de croissance. Les valeurs du poids humide et de la longueur des animaux à un stade NF supérieur à 60 sont donc censurées et exclues des analyses des moyennes et des médianes des répliquats. Deux approches différentes sont envisageables pour analyser les paramètres de croissance.

72. L'une d'elle consiste à ne prendre en compte que les têtards à un stade de développement inférieur ou égal à 60 pour les analyses statistiques du poids humide et/ou de la LMC. Cette approche est supposée apporter des informations suffisamment solides sur la sévérité des éventuels effets sur la croissance, à condition que la proportion d'animaux exclus de l'analyse demeure limitée (≤ 20 %). Si un nombre plus important de têtards se caractérisent par un stade de développement dépassant 60 (≥ 20 %) dans une ou plusieurs concentrations nominales, il convient d'effectuer une ANOVA à deux facteurs intégrant une structure de variance sous-jacente pour évaluer les effets sur la croissance dus aux traitements chimiques sur l'ensemble des individus, tout en prenant en compte l'effet du stade de développement avancé sur la croissance. L'annexe 3 propose des orientations concernant l'ANOVA à deux facteurs (poids et longueur).

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2007) Final report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. N° 76, Paris.
2. OCDE (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 - Multi-chemical Interlaboratory Study. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. N° 77. Paris
3. OCDE (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. N° 92. Paris
4. OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. N° 23. Paris
5. ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphie, PA
6. ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). E 1439-98
7. Kahl,M.D., Russom,C.L., DeFoe,D.L. & Hammermeister,D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere* **39**, pp. 539-551
8. Nieuwkoop,P.D. & Faber,J. (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York
9. OCDE (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. N° 82. Paris
10. Dodd,M.H.I. & Dodd,J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts,B. (ed.), Academic Press, New York, pp. 467-599
11. OCDE (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement. Série sur les essais et évaluations. N° 54. Paris
12. Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Rapport. Aquatic Toxicology*, 76; pp. 69–92.

Annexe 1**Tableau 1. Conditions expérimentales de l'essai de métamorphose des amphibiens sur 21 jours.**

Animaux d'essai	Larves de <i>Xenopus laevis</i>	
Stade larvaire initial	Stade 51 selon Nieuwkoop et Faber	
Durée d'exposition	21 jours	
Critères de sélection des larves	stade de développement et longueur totale (optionnelle)	
Concentrations d'essai	Minimum de 3 concentrations s'étendant sur environ une unité de l'ordre de grandeur	
Régime d'exposition	Avec écoulement continu (de préférence) et/ou renouvellement statique	
Vitesse d'écoulement dans le système d'essai	25 mL/min (renouvellement complet du volume environ toutes les 2.7 h)	
Principales observations rapportées – Calendrier des relevés	Mortalité	Quotidiennement
	Stade de développement	J7 et 21
	Longueur des pattes postérieures	J7 et 21
	Longueur museau-cloaque	J7 et 21
	Poids du corps humide	J7 et 21
	Histologie de la thyroïde	J21
Eau de dilution – Témoin du laboratoire	Eau du robinet déchlorée (filtrée sur charbon) ou source équivalente issue du laboratoire	
Densité de larves	20 larves/récipient d'essai (5/L)	
Solution d'essai/Récipient d'essai	4 – 10 L (10 – 15 cm d'eau minimum)/récipient d'essai en verre ou en acier inoxydable (p. ex. 22.5 cm x 14 cm x 16.5 cm)	
Réplication	4 récipients d'essai répliqués par concentration d'essai et témoin	
Taux de mortalité admis chez les témoins	≤ 10 % par récipient d'essai répliqué	
Fixation thyroïdienne	Nombre d'individus concernés	Tous les têtards (5/répliquat évalués initialement)
	Région	Tête ou corps entier
	Fluide de fixation	Fixateur de Davidson
Alimentation	Nourriture	Sera Micron® ou équivalent
	Quantité – Fréquence	Consulter le tableau 1 présentant le régime alimentaire adapté à l'emploi de Sera Micron®
Éclairage	Période d'exposition lumineuse	12 h de lumière pour 12 h d'obscurité
	Intensité	600 à 2 000 lux (mesurée à la surface de l'eau)
Température de l'eau	22 ± 1 °C	
pH	6.5 – 8.5	

Concentration d'oxygène dissous (OD)	> 3.5 mg/L (> 40 % de la saturation de l'air)
Calendrier d'échantillonnage pour les analyses chimiques	Une fois par semaine (4 échantillonnages/essai)

Annexe 2**Tableau pour le rapport des données brutes et résumées****Annexe 2- Tableau 1. Informations générales sur le produit chimique testé.**

Informations sur le produit chimique

*Entrer le produit chimique, les unités des concentrations, et les traitements***Produit chimique testé:**

Unité des concentrations:

Traitement 1:

Traitement 2:

Traitement 3:

Traitement 4:

Date (jour 0):

Entrer la date (jj/mm/aa)

Date (jour 7):

Entrer la date (jj/mm/aa)

Date (jour 21):

Entrer la date (jj/mm/aa)

Annexe 2- Tableau 2. Feuille de collecte des données brutes pour les jours 7 et 21.

DAY X

DATE 00/00/00

ROW	Concentration	Numéro du traitement	Numéro du répliquat	Numéro de l'individu	Identifiant de l'individu	Stade de développement	Longueur LMC (mm)	Longueur des pattes postérieures (mm)	Poids du corps humide (mg)
	TRT	TRT #	REP	IND	ID #	STAGE	BL	HLL	WEIGHT
1	0.00	1							
2	0.00	1							
3	0.00	1							
4	0.00	1							
5	0.00	1							
6	0.00	1							
7	0.00	1							
8	0.00	1							
9	0.00	1							
10	0.00	1							
11	0.00	1							
12	0.00	1							
13	0.00	1							
14	0.00	1							
15	0.00	1							
16	0.00	1							
17	0.00	1							
18	0.00	1							
19	0.00	1							
20	0.00	1							
21	0.00	2							
22	0.00	2							
23	0.00	2							
24	0.00	2							
25	0.00	2							
26	0.00	2							
27	0.00	2							
28	0.00	2							
29	0.00	2							
30	0.00	2							
31	0.00	2							
32	0.00	2							
33	0.00	2							
34	0.00	2							
35	0.00	2							
36	0.00	2							
37	0.00	2							
38	0.00	2							
39	0.00	2							
40	0.00	2							
41	0.00	3							
42	0.00	3							
43	0.00	3							
44	0.00	3							
45	0.00	3							
46	0.00	3							
47	0.00	3							
48	0.00	3							
49	0.00	3							
50	0.00	3							
51	0.00	3							
52	0.00	3							
53	0.00	3							
54	0.00	3							
55	0.00	3							
56	0.00	3							
57	0.00	3							
58	0.00	3							
59	0.00	3							
60	0.00	3							
61	0.00	4							
62	0.00	4							
63	0.00	4							
64	0.00	4							
65	0.00	4							
66	0.00	4							
67	0.00	4							
68	0.00	4							
69	0.00	4							
70	0.00	4							
71	0.00	4							
72	0.00	4							
73	0.00	4							
74	0.00	4							
75	0.00	4							
76	0.00	4							
77	0.00	4							
78	0.00	4							
79	0.00	4							
80	0.00	4							

Annexe 2- Tableau 3. Valeurs résumées calculées pour les observations des jours 7 et 21

TRT	REP	Stade de développement			LMC (mm)		Longueur des pattes postérieures (mm)		Poids (mg)	
		MIN	MEDIANE	MAX	MOYENNE	ECART TYPE	MOYENNE	ECART TYPE	MOYENNE	ECART TYPE
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Note: les calculs effectués dans ce tableau sont normalement associés avec les données entrées dans le tableau 2.

Annexe 2- Tableau 4. Données de mortalité quotidienne

Jour	Date	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#VALUE!																
2	#VALUE!																
3	#VALUE!																
4	#VALUE!																
5	#VALUE!																
6	#VALUE!																
7	#VALUE!																
8	#VALUE!																
9	#VALUE!																
10	#VALUE!																
11	#VALUE!																
12	#VALUE!																
13	#VALUE!																
14	#VALUE!																
15	#VALUE!																
16	#VALUE!																
17	#VALUE!																
18	#VALUE!																
19	#VALUE!																
20	#VALUE!																
21	#VALUE!																
Somme répliquat		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Somme traitement		0				0				0				0			

Note: les calculs effectués dans ce tableau sont normalement associés avec les données entrées dans le tableau 1.

Annexe 2 – Tableau 5. Critères de qualité de l'eau

Système d'exposition (flux continu/renouvellement statique):

Température:

Intensité lumineuse:

Cycle jour-nuit:

Alimentation:

Fréquence de l'alimentation:

pH de l'eau:

Concentration d'iode dans la solution d'essai:

Annexe 2- Tableau 6. Résumé des données de chimie.

Nom du produit chimique:																					
CAS #:																					
jour	Date	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#VALUE!																				
2	#VALUE!																				
3	#VALUE!																				
4	#VALUE!																				
5	#VALUE!																				
6	#VALUE!																				
7	#VALUE!																				
8	#VALUE!																				
9	#VALUE!																				
10	#VALUE!																				
11	#VALUE!																				
12	#VALUE!																				
13	#VALUE!																				
14	#VALUE!																				
15	#VALUE!																				
16	#VALUE!																				
17	#VALUE!																				
18	#VALUE!																				
19	#VALUE!																				
20	#VALUE!																				
21	#VALUE!																				

Note: les calculs effectués sont normalement associés avec les données entrées dans le tableau 1.

Annexe 2- Tableau 7. Tableau de rapport des critères essentiels utilisés en histopathologie.

Date:		Produit chimique:				Pathologiste:			
ID Animal témoin - repliquat 1		Hypertrophie de la glande thyroïde				Hypertrophie de la glande thyroïde			
ID Animal témoin - repliquat 2		Atrophie de la glande thyroïde				Atrophie de la glande thyroïde			
		Hypertrophie des cellules folliculaires				Hypertrophie des cellules folliculaires			
		Hyperplasie des cellules folliculaires				Hyperplasie des cellules folliculaires			
Total:									

ID Animal témoin - repliquat 1		Hypertrophie de la glande thyroïde				Hypertrophie de la glande thyroïde			
ID Animal témoin - repliquat 2		Atrophie de la glande thyroïde				Atrophie de la glande thyroïde			
		Hypertrophie des cellules folliculaires				Hypertrophie des cellules folliculaires			
		Hyperplasie des cellules folliculaires				Hyperplasie des cellules folliculaires			
Total:									

Dose Animal ID - repliquat 1		Hypertrophie de la glande thyroïde				Hypertrophie de la glande thyroïde			
Dose Animal ID - repliquat 2		Atrophie de la glande thyroïde				Atrophie de la glande thyroïde			
		Hypertrophie des cellules folliculaires				Hypertrophie des cellules folliculaires			
		Hyperplasie des cellules folliculaires				Hyperplasie des cellules folliculaires			
Total:									

Dose Animal ID - replicate 1		Hypertrophie de la glande thyroïde				Hypertrophie de la glande thyroïde			
Dose Animal ID - replicate 2		Atrophie de la glande thyroïde				Atrophie de la glande thyroïde			
		Hypertrophie des cellules folliculaires				Hypertrophie des cellules folliculaires			
		Hyperplasie des cellules folliculaires				Hyperplasie des cellules folliculaires			
Total:									

Annexe 2-Tableau 9. Description narrative des observations histopathologiques

Date:
 Produit
 chimique:
 Pathologiste:

Description narrative

Animal témoin ID - répliquat 1		
Animal témoin ID - répliquat 2		
Dose Animal ID - répliquat 1		
Dose Animal ID - répliquat 2		
Dose Animal ID - répliquat 1		
Dose Animal ID - répliquat 2		
Dose Animal ID - répliquat 1		
Dose Animal ID - répliquat 2		

Annexe 2-Tableau 10. Tableau de rapport des données résumées pour le jour J (7 ou 21) de l'EMA.

Observation	Repliquat	Témoïn				Traitement 1					Traitement 2					Traitement 3				
		Moyenne	Ec. Type	CV	N	Moyenne	Ec. Type	CV	N	p-value	Moyenne	Ec. Type	CV	N	p-value	Moyenne	Ec. Type	CV	N	p-value
Longueur patte postérieure (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Moyenne:																			
LMC (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Moyenne:																			
Poids humide (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Moyenne:																			

Annexe 2- Tableau 11. Tableau de rapport des données de stade de développement résumées pour le jour J (7 ou 21) de l'EMA.

Stade de développement	Repliquat	Témoïn				Traitement 1					Traitement 2					Traitement 3				
		Médiane	Min	Max	N	Médiane	Min	Max	N	p-value	Médiane	Min	Max	N	p-value	Médiane	Min	Max	N	p-value
	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Moyenne:																			

Annexe 3

Autres méthodes d'analyse du poids et de la longueur dans le cas où un stade de développement avancé concerne plus de 20 % des têtards dans une ou plusieurs concentrations

Si un nombre plus important de têtards se caractérisent par un stade de développement dépassant 60 (≥ 20 %) dans une ou plusieurs concentrations nominales, il convient d'effectuer une ANOVA à deux facteurs intégrant une structure de variance sous-jacente pour évaluer les effets sur la croissance dus aux traitements chimiques sur l'ensemble des individus, tout en prenant en compte l'effet du stade de développement avancé sur la croissance.

Il s'agit là d'exploiter l'intégralité des données, mais de prendre en compte l'effet du stade de développement avancé. À cette fin, il est possible de recourir à une ANOVA à deux facteurs intégrant une structure de variance sous-jacente. Ainsi, le critère Stade avancé = OUI concerne tout animal présentant un stade de développement supérieur ou égal à 61. Dans le cas contraire, le critère est défini par Stade avancé = NON. L'ANOVA à deux facteurs concernant les interactions entre la concentration et le Stade avancé est ainsi rendue possible, avec rep(Conc) comme facteur aléatoire et Têtard(rep) comme effet aléatoire. Cette méthode traite toujours le répliquat comme unité d'analyse, et fournit essentiellement les mêmes résultats qu'une analyse des moyennes rep*Stade avancé, pondérée par le nombre d'animaux par moyenne. Si les données ne répondent pas à l'exigence de normalité et d'homogénéité de la variance posée par une ANOVA, une transformation par rang normalisée peut être effectuée pour résoudre le problème.

En plus du test F classique de l'ANOVA sur les effets des Conc, Stade avancé et leurs interactions, le test F d'interaction peut être scindé en deux test F d'ANOVA, l'un d'entre eux traitant les réponses moyennes obtenues sur l'ensemble des concentrations avec le critère Stade avancé = NON, tandis que le second se fonde sur les réponses moyennes relevées pour toutes les concentrations correspondant à Stade avancé = OUI. De plus amples comparaisons entre les moyennes des divers traitements par rapport au témoin sont menées au sein de chaque groupe défini par le critère Stade avancé. Une analyse tendancielle peut être effectuée en employant les contrastes appropriés ou une simple comparaison par paires, si la fonction dose-réponse se révèle non monotone chez un des groupes caractérisés par le critère Stade avancé. Une correction des p-valeurs selon Bonferroni - Holm n'est requise que lorsque la partie du test F correspondante n'est pas significative. Ces opérations sont prises en charge par SAS, et probablement d'autres logiciels statistiques. Des complications peuvent survenir si certaines concentrations ne comptent aucun animal présentant un stade de développement avancé, cependant ces situations peuvent être résolues simplement.