

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

Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire

INTRODUCTION

1. La présente ligne directrice 236 décrit un essai de toxicité aiguë chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) au stade embryonnaire. Cet essai vise à déterminer la toxicité aiguë des produits chimiques sur les poissons au stade embryonnaire. Il repose sur des études et des activités de validation menées sur le poisson-zèbre (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). Il a été appliqué avec succès à une large gamme de substances présentant différents modes d'action, solubilités, volatilités et hydrophobicités (voir les paragraphes 15 et 16).
2. Les définitions utilisées dans cette Ligne directrice pour les essais sont présentées à l'annexe 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. Les œufs de poisson-zèbre fraîchement fécondés sont exposés au produit chimique testé durant une période de 96 heures. Toutes les 24 heures, jusqu'à quatre observations apicales utilisées comme indicateurs de létalité sont enregistrées (6) : (i) la coagulation des œufs fécondés, (ii) l'absence de formation de somites, (iii) le non-détachement du bourgeon caudal dans le sac vitellin, (iv) l'absence de battements du cœur. À la fin de la période d'exposition, on détermine la toxicité aiguë d'après le résultat positif obtenu en ce qui concerne l'une des quatre observations apicales notées, et l'on calcule la CL₅₀.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

4. En ce qui concerne les propriétés du produit chimique testé, les informations suivantes sont utiles : formule structurale, poids moléculaire, pureté, stabilité dans l'eau et à la lumière, pK_a et K_{o/e}, hydrosolubilité, pression partielle de la forme gazeuse du composé ainsi que résultats d'un essai de biodégradabilité facile (LD 301 ou LD 310 de l'OCDE)(17)(18). On peut utiliser la solubilité et la pression de vapeur pour calculer la constante de Henry, qui indique les risques de perte par évaporation du produit chimique testé. Pour déterminer la concentration du produit chimique testé dans les solutions d'essai, il convient d'appliquer une méthode d'analyse fiable, dont la précision et la limite de détection sont connues et mentionnées dans le rapport.
5. Si la Ligne Directrice est utilisée pour tester un mélange, sa composition devrait être déterminée dans la mesure du possible, p.ex. par l'identité chimique de ses constituants, leur présence et quantité, ainsi que leur propriétés spécifiques (telles que mentionnées au paragraphe précédent). Avant d'utiliser la Ligne Directrice pour tester un mélange à des fins réglementaires, il convient de vérifier si les résultats seront acceptables dans le cadre réglementaire imposé.
6. En ce qui concerne les produits chimiques pouvant être activés via le métabolisme, des études montrent que les embryons de poisson-zèbre ont des capacités de biotransformation (18)(19)(20)(21).

Cependant, la capacité métabolique des embryons de poissons n'est pas toujours du même ordre de grandeur que celle des poissons juvéniles ou adultes. Ainsi, les propriétés protoxiques de l'alcool allylique (9) n'ont pas été reconnues par le présent essai. Par conséquent, si certains éléments indiquent que les métabolites ou d'autres produits de transformation pertinents peuvent être plus toxiques que le composé initial, il est recommandé d'inclure également ces métabolites / produits de transformation dans l'essai et d'utiliser également ces résultats au moment de conclure sur la toxicité du produit chimique testé, ou sinon de conduire un autre essai qui tient mieux compte du métabolisme.

7. On suppose que les embryons ne seront pas sensibles aux produits chimiques de poids moléculaire $\geq 3\text{kDa}$, dont l'encombrement moléculaire est très important, ou aux produits chimiques qui retardent l'éclosion, ce qui risque d'empêcher ou de réduire l'exposition après l'éclosion, en raison de la biodisponibilité limitée de ces produits chimiques, pour lesquels d'autres essais de toxicité pourraient être plus adaptés.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

8. Pour que les résultats de l'essai soient valables, les critères suivants doivent être remplis :
1. Le taux global de fécondation de l'ensemble des œufs collectés doit être supérieur ou égal à 70 % dans l'ensemble testé.
 2. La température de l'eau doit être maintenue à 26 ± 1 °C dans les enceintes d'essai pendant toute la durée de l'essai.
 3. Le taux global de survie des embryons dans le témoin négatif (contenant l'eau de dilution) et, le cas échéant, dans le témoin contenant le solvant doit être supérieur ou égal à 90 % jusqu'à la fin de la période d'exposition de 96 heures.
 4. L'exposition au témoin positif (4.0 mg/L de 3,4-dichloroaniline pour le poisson-zèbre, par exemple) doit avoir pour résultat une mortalité de 30 % minimum à la fin de la période d'exposition de 96 heures.
 5. Le taux d'éclosion dans le témoin négatif (et, le cas échéant, dans le témoin de solvant) doit être supérieur ou égal à 80 % à la fin de la période d'exposition de 96 heures.
 6. À la fin de la période d'exposition de 96 heures, la concentration d'oxygène dissous dans le témoin négatif et la concentration d'essai maximale doivent être supérieures ou égales à 80 % de la valeur de saturation.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

9. On trouvera à l'annexe 2 des indications sur les conditions d'entretien et d'expérimentation recommandées.

Appareillage

10. Le matériel suivant est nécessaire :
- a. récipients en verre ou tout autre matériau chimiquement inerte, suffisamment grands par rapport à la charge recommandée (voir le paragraphe 14, « Entretien des poissons géniteurs ») ;
 7. microscope inversé et/ou binoculaire d'une capacité de grossissement d'au moins 80×. Si la température de la pièce où sont notées les observations ne peut pas être réglée à 26 ± 1 °C, une

platine chauffante à mouvements croisés ou d'autres méthodes permettant de maintenir la température sont nécessaires ;

8. enceintes d'essai ; par exemple, plaques standard à 24 puits d'une profondeur de 20 mm environ (voir le paragraphe 10, « Enceintes d'essai ») ;
9. film autocollant, par exemple, pour couvrir les plaques 24 puits ;
10. incubateur ou pièce climatisée avec température contrôlée, permettant le maintien de la température à 26 ± 1 °C dans les puits (ou les enceintes) ;
11. pH-mètre ;
12. oxygénomètre ;
13. matériel de détermination de la dureté de l'eau et de la conductivité ;
14. piège à frai : plats à instruments en verre, acier inoxydable ou tout autre matériau inerte ; grille (mailles de 2 ± 0.5 mm) en acier inoxydable ou tout autre matériau inerte pour protéger les œufs pondus ; substrat de frai (plantes artificielles en matériau inerte, par exemple) [OCDE 229, Annexe 4a (23)] ;
15. pipettes à large ouverture pour la collecte des œufs ;
16. récipients en verre pour préparer différentes concentrations d'essai ainsi que l'eau de dilution (bêchers, fioles graduées, éprouvettes graduées et pipettes graduées) ou pour collecter les œufs de poisson-zèbre (bêchers, plats de cristallisation, etc.) ;
17. en cas de recours à un autre mode d'exposition tel qu'un système dynamique (24) ou passif (25) pour la conduite de l'essai, on utilisera les installations et matériels appropriés.

Enceintes d'essai

11. On utilisera des enceintes d'essai en verre ou en polystyrène (exemple : plaques à 24 puits d'une capacité de remplissage de 2,5 – 5 mL par puits). En cas de suspicion d'adsorption au polystyrène (composants planes non polaires, ayant un K_{OE} élevé, par exemple), on utilisera des matériaux inertes tels que le verre pour réduire les pertes dues à l'adsorption (26). Les enceintes d'essai seront positionnées de façon randomisée dans l'incubateur.

Eau et conditions d'expérimentation

12. Il est recommandé de diluer l'eau d'entretien pour atteindre les niveaux de dureté typiques d'une grande variété d'eaux de surface. On utilisera de l'eau reconstituée pour préparer l'eau de dilution (27). Le degré de dureté obtenu doit être équivalent à 100-300 mg/L de CaCO_3 pour empêcher la précipitation excessive du carbonate de calcium. Il est possible d'utiliser une autre eau de surface ou eau de puits bien caractérisée. On peut adapter l'eau reconstituée pour obtenir une eau d'entretien de faible dureté en la diluant avec de l'eau désionisée selon un rapport de 1:5 maximum jusqu'à atteindre une dureté minimale de 30-35 mg/L de CaCO_3 . L'eau est aérée jusqu'à saturation en oxygène avant l'ajout du produit chimique. Tout au long de l'essai, la température dans les puits doit être maintenue à 26 ± 1 °C. Le pH doit être compris entre 6.5 et 8.5, et ne doit pas varier de plus de 1.5 unité dans cette plage au cours de l'essai. Si on pense que le pH ne restera pas dans cette plage, alors il convient de procéder à un ajustement de pH avant d'initier l'essai. Le pH doit être ajusté de telle façon que la concentration de la solution-mère ne change pas de manière significative et qu'il n'y ait pas de réaction chimique ni de

précipitation du produit chimique testé. Il est recommandé d'utiliser de l'acide chlorhydrique (HCl) et de l'hydroxyde de sodium (NaOH) pour corriger le pH des solutions contenant le produit chimique testé.

Solutions d'essai

13. Des solutions d'essai des concentrations sélectionnées peuvent être préparées, par exemple par dilution d'une solution-mère. Les solutions-mères doivent, de préférence, être préparées par simple mélange ou agitation du produit chimique testé dans l'eau de dilution par des moyens mécaniques (agitation ou ultrasons, par exemple). Si le produit chimique testé se dissout difficilement dans l'eau, on suivra les procédures décrites dans le document d'orientation n° 23 de l'OCDE sur les essais de substances difficiles (28). On évitera d'utiliser des solvants ; leur usage peut néanmoins se révéler nécessaire dans certains cas pour produire une solution-mère convenablement concentrée. Si un solvant est quand même utilisé pour aider à la préparation de la solution-mère, sa concentration finale ne devra pas dépasser 100 µl/l et devra être identique dans tous les récipients d'essai. En cas d'utilisation d'un solvant, un autre témoin contenant le solvant est nécessaire.

Entretien des poissons géniteurs

14. Un stock de poissons-zèbres reproducteurs sauvages et non exposés, dont le taux de fécondation des œufs est bien documenté, devra être utilisé pour la production des œufs. Les poissons ne doivent pas présenter de symptômes d'infection et de maladie discernables à l'examen macroscopique et ne doivent pas avoir reçu de traitement pharmaceutique (aigu ou prophylactique) au cours des deux mois précédant le frai. Les poissons géniteurs sont maintenus dans des aquariums ayant une capacité de charge recommandée de 1 L d'eau par poisson et une photopériode fixe de 12-16 heures (29)(30)(31)(32)(33). La vitesse de filtration doit être ajustée de façon optimale ; des vitesses de filtration excessives provoquant de fortes perturbations de l'eau sont à éviter. En ce qui concerne les conditions d'alimentation, on consultera l'[annexe 2](#). Il convient d'éviter une alimentation trop abondante, et la qualité de l'eau ainsi que la propreté des aquariums devront être contrôlées régulièrement et, si nécessaire, rétablies à l'état initial.

Épreuve de compétence

15. En tant que substance de référence, le 3,4-dichloroaniline [utilisé dans les études de validation (1)(2)] doit être testé dans une gamme complète de concentrations-réponses pour vérifier la sensibilité de la souche de poissons utilisée, de préférence deux fois par an. Les laboratoires qui entreprennent cet essai pour la première fois devront utiliser la substance de référence. Un laboratoire peut utiliser cette substance pour démontrer sa compétence technique à réaliser l'essai avant de soumettre les données à des fins réglementaires.

Production des œufs

16. Les œufs de poisson-zèbre peuvent être produits *via* des groupes de frai (dans des cuves de frai individuels) ou *via* un frai de masse (dans les cuves d'entretien). Dans le cas des groupes de frai, les mâles et les femelles (dans un rapport de 2:1, par exemple) d'un groupe reproducteur sont placés dans des cuves de frai pendant quelques heures avant la tombée du jour précédant l'essai. Sachant qu'il se peut que les groupes de frai de poissons-zèbres ne parviennent pas à frayer, il est recommandé d'utiliser en parallèle au moins trois cuves de frai. Pour éviter les biais génétiques, les œufs sont collectés à partir de trois groupes reproducteurs minimum, mélangés et sélectionnés au hasard.

17. Pour la collecte des œufs, des pièges à frai sont placés dans les cuves de frai ou dans les cuves d'entretien avant la tombée du jour précédant l'essai, ou avant les premières lueurs du jour de l'essai. Pour empêcher la prédation des œufs par les poissons-zèbres adultes, on couvre les pièges à frai avec une grille en matériau inerte composée de mailles de taille appropriée (approx. 2 ± 0.5 mm). Si cela est jugé

nécessaire, des plantes artificielles en matériau inerte (plastique, verre, etc.) peuvent être fixées à la grille pour servir de stimulus de frai (3)(4)(5)(23)(35). On utilisera des matières plastiques patinées et qui ne libèrent pas de substances contaminantes, telles que les phtalates. L'accouplement, le frai et la fécondation ont lieu avant l'expiration d'un délai de 30 minutes à compter de l'apparition des premières lueurs du jour, et les pièges à frai avec les œufs collectés peuvent être retirés délicatement. Il est recommandé de rincer les œufs avec de l'eau reconstituée après le retrait des œufs des pièges à frai.

Différenciation des œufs

18. À 26°C, les œufs fécondés subissent la première segmentation au bout d'une quinzaine de minutes, et les segmentations synchrones consécutives forment 4, 8, 16 et 32 blastomères (voir l'annexe 3) (35). À ces stades, le développement d'une blastula permet d'identifier clairement les œufs fécondés.

PROCÉDURE

Conditions d'exposition

19. Vingt embryons par concentration (un embryon par puits) sont exposés au produit chimique testé. L'exposition au produit chimique testé devrait permettre de maintenir les concentrations d'essai autour de $\pm 20\%$ de la concentration nominale pendant la durée de l'essai. Si cela s'avère impossible au cours d'un essai statique, un système de renouvellement semi-statique devra être envisagé (p.ex. avec un renouvellement toutes les 24 heures). Dans ce cas, les concentrations d'exposition devront être vérifiées au minimum à la concentration la plus haute et la concentration la plus basse au début et à la fin de chaque intervalle de renouvellement de la solution (voir paragraphe 36). Si une concentration d'exposition autour de $\pm 20\%$ de la concentration nominale ne peut être maintenue, toutes les concentrations d'exposition doivent être mesurées au début et à la fin de chaque intervalle de renouvellement (voir paragraphe 36). Lors du renouvellement, on veillera à ce que les embryons soient toujours recouverts d'une petite quantité d'anciennes solutions d'essai pour éviter leur dessiccation. Il est possible d'adapter le protocole de l'essai pour respecter les exigences applicables aux essais de produits chimiques spécifiques [par exemple, systèmes de dosage dynamiques (24) ou passifs (25) pour les produits chimiques facilement dégradables ou hautement adsorbants (29), ou autres systèmes pour les produits chimiques volatiles (37)(38)]. Dans tous les cas, on veillera à stresser le moins possible les embryons. Les enceintes d'essai doivent être conditionnées aux solutions d'essai pendant au moins 24 h avant le lancement de l'essai. Les conditions d'expérimentation sont résumées à l'annexe 2.

Concentrations d'essai

20. Pour répondre aux exigences statistiques, on doit normalement utiliser cinq concentrations du produit chimique testé espacées d'un facteur constant ne dépassant pas 2.2. Si l'on utilise moins de cinq concentrations, on doit fournir une justification. La plus forte concentration testée devrait engendrer de préférence une létalité de 100 % tandis que la plus faible concentration testée ne devrait engendrer aucun effet observable, tel que défini au paragraphe 28. Le fait de procéder à un essai de détermination de l'ordre de grandeur avant l'essai définitif permettra de sélectionner la plage de concentrations appropriée. La détermination de l'ordre de grandeur est généralement faite au moyen de 10 embryons par concentration. Selon les instructions ci-dessous, on doit procéder à l'essai en utilisant des plaques à 24 puits. Si l'on utilise différentes enceintes d'essai (petites boîtes de Pétri, par exemple) ou si l'on teste un plus grand nombre de concentrations, les instructions doivent être adaptées en conséquence.

21. On trouvera au paragraphe 27 et à la figure 1 de l'annexe 4 des informations détaillées et des instructions visuelles concernant la répartition des concentrations dans les plaques à 24 puits.

Témoins

22. Les cuves témoins contenant l'eau de dilution doivent servir à la fois de témoins négatifs et de témoins à l'intérieur d'une plaque. Si l'on observe que plus d'un embryon est mort dans le témoin de la plaque, la plaque est rejetée, ce qui réduit le nombre de concentrations utilisées pour déduire la CL_{50} . En cas de rejet d'une plaque entière, la capacité à évaluer et à discerner les effets observés peut devenir plus difficile, en particulier si la plaque rejetée est celle contenant le témoin solvant ou une plaque dans laquelle les embryons traités sont également touchés. Dans le premier cas, l'essai doit être répété. Dans le second cas, la perte de la totalité d'un ou de plusieurs groupe(s) de traitement en raison de la mortalité dans la plaque témoin peut restreindre la possibilité d'évaluer les effets et de déterminer la valeur de la CL_{50} .

23. Un témoin positif à une concentration fixe de 4 mg/L de 3,4-dichloroaniline est prévu pour chaque lot d'œufs utilisé pour l'essai.

24. Si un solvant est utilisé, un groupe supplémentaire de 20 embryons est exposé au solvant sur une plaque à 24 puits séparée, qui sert ainsi de témoin de solvant. Pour que l'essai soit considéré comme acceptable, on doit démontrer que le solvant n'a pas d'effets significatifs sur le temps d'éclosion ni sur la survie et qu'il ne produit pas d'autres effets néfastes sur les embryons (cf. paragraphe 7c).

Début de l'exposition et durée de l'essai

25. L'essai démarre dès que possible après que la fécondation des œufs et se termine après 96 h d'exposition. Les embryons doivent être immergés dans les solutions d'essai avant le début de la segmentation du blastodisque ou, au plus tard, avant l'étape des 16 cellules. Pour que l'exposition démarre aussitôt que possible, on sélectionne au moins deux fois le nombre d'œufs nécessaires par groupe de traitement et on les répartit au hasard dans les concentrations et témoins respectifs (exemple : sur des plaques de cristallisation de 100 mL ; les œufs doivent être recouverts entièrement) au plus tard 90 minutes après fécondation.

26. Les œufs fécondés viables doivent être séparés des œufs non fécondés puis transférés vers les plaques à 24 puits pré-conditionnées pendant 24 h et remplies de nouveau avec 2 mL/puits de solutions d'essai dans un délai de 180 minutes après la fécondation. On utilise un stéréomicroscope (permettant de préférence un grossissement $\geq 30\times$) pour sélectionner des œufs fécondés en phase de segmentation et sans trace d'irrégularités flagrantes lors de la segmentation (asymétrie, formation de vésicules, etc.) ni de lésions du chorion. En ce qui concerne la collecte et la séparation des œufs, on consultera les figures 1 et 3 de l'[annexe 3](#) ainsi que la figure 2 de l'[annexe 4](#).

Répartition des œufs sur les plaques à 24 puits

27. Les œufs sont répartis comme suit sur les plaques à puits (voir également la figure 1 de l'[annexe 4](#)) :

- 20 œufs sur une plaque pour chaque concentration d'essai ;
- 20 œufs servant de témoin de solvant sur une plaque (si nécessaire) ;
- 20 œufs servant de témoin positif sur une plaque ;
- 4 œufs immergés dans l'eau de dilution, servant de témoin interne à la plaque, sur chacune des plaques ci-dessus ;
- 24 œufs immergés dans l'eau de dilution, servant de témoin négatif sur une plaque.

Observations

28. Les observations apicales faites sur chaque embryon d'essai portent sur : la coagulation des embryons, l'absence de formation de somites, le non-détachement de la queue, l'absence de battements du cœur (tableau 1). Ces observations servent à déterminer la létalité : si l'une des ces observations donne un résultat positif, cela signifie que l'embryon de poisson-zèbre est mort. De plus, l'éclosion est enregistrée chaque jour dans les groupes de traitement et les groupes témoins à partir de 48 h. Les observations sont enregistrées toutes les 24 h, jusqu'à la fin de l'essai.

Tableau 1. Observations apicales de la toxicité aiguë chez les embryons de poisson-zèbre 24 à 96 h après fécondation

	Durées d'exposition			
	24 h	48 h	72 h	96 h
Embryons coagulés	+	+	+	+
Absence de formation de somites	+	+	+	+
Non-détachement de la queue	+	+	+	+
Absence de battements du cœur		+	+	+

29. *Coagulation de l'embryon* : Les embryons coagulés sont d'un blanc laiteux et apparaissent sombres au microscope (voir la figure 1 de l'[annexe 5](#)). Le nombre d'embryons coagulés est déterminé au bout de 24, 48, 72 et 96 h.

30. *Absence de formation de somites* : À $26 \pm 1^\circ\text{C}$, une vingtaine de somites se forment au bout de 24 h (voir la figure 2 de l'[annexe 5](#)) chez un embryon de poisson-zèbre se développant normalement. Un embryon normalement développé a des mouvements spontanés (contractions des deux côtés). Ces mouvements spontanés indiquent la formation de somites. L'absence de somites est enregistrée au bout de 24, 48, 72 et 96 h. La non-formation de somites au bout de 24 h peut être due à un retard général de développement. Au bout de 48 h au plus tard, la formation de somites devrait avoir rattrapé son retard. Si ce n'est pas le cas, les embryons sont considérés comme morts.

31. *Non-détachement de la queue* : Chez un embryon de poisson-zèbre se développant normalement, le détachement de la queue (voir la figure 3 de l'[annexe 5](#)) du vitellus est observé après élongation postérieure du corps embryonnaire. L'absence de détachement de la queue est enregistrée au bout de 24, 48, 72 et 96 h.

32. *Absence de battements du cœur* : Chez un embryon de poisson-zèbre se développant normalement, à $26 \pm 1^\circ\text{C}$, les battements du cœur sont visibles au bout de 48 h (voir la figure 4 de l'[annexe 5](#)). On sera particulièrement vigilant au moment de noter ce paramètre ; en effet, des battements du cœur irréguliers (erratiques) ne doivent *pas* être enregistrés comme létaux. De plus, des battements de cœur visibles sans circulation dans l'aorte abdominale sont considérés comme non létaux. Pour noter ce paramètre, on doit avoir observé des embryons ne montrant pas de battement du cœur avec un grossissement supérieur ou égal à $80\times$ pendant au moins une minute. L'absence de battements du cœur est enregistrée au bout de 48, 72 et 96 h.

33. Les taux d'éclosion de tous les groupes de traitement et les groupes témoins doivent être enregistrés à compter de l'expiration d'un délai de 48 h puis notés dans le rapport. Bien que l'éclosion ne soit pas utilisée pour le calcul de la CL_{50} , elle assure l'exposition de l'embryon sans la fonction de barrière que peut jouer le chorion, et à ce titre elle peut aider à l'interprétation des données.

34. On trouvera dans les annexes 3 et 5 une description détaillées du développement normal (36) et des exemples de développement anormal des embryons de poisson-zèbre.

Dosages analytiques

35. Au début et à la fin de l'essai, on mesure le pH, la dureté totale et la conductivité dans le(s) témoin(s) et dans la concentration d'essai maximale. Dans les essais semi-statiques (essais avec renouvellement), on doit mesurer le pH avant et après le renouvellement de l'eau. La concentration d'oxygène dissous est mesurée à la fin de l'essai dans les témoins négatifs et dans la concentration d'essai maximale avec des œufs viables ; les résultats doivent répondre aux critères de validité de l'essai (voir le paragraphe 7f). Si l'on craint que la température ne soit pas la même dans toutes les plaques à 24 puits, la température sera mesurée dans trois cuves sélectionnées au hasard. On doit enregistrer la température de préférence en continu au cours de l'essai ou, du moins, quotidiennement.

36. Dans un système statique, la concentration du produit chimique testé doit être mesurée au moins à la plus faible et la plus forte des concentrations d'essai, mais de préférence dans tous les traitements, au début et à la fin de l'essai. Dans un système d'essai semi-statique (avec renouvellement) où la concentration du produit chimique testé ne devrait pas s'écarter de plus de 20 % des valeurs nominales, il est recommandé d'analyser au moins la plus faible et la plus forte des concentrations d'essai juste après leur préparation et immédiatement avant le renouvellement. Si l'on prévoit que la concentration du produit chimique testé s'écartera de plus de 20 % des valeurs nominales, il faut analyser toutes les concentrations d'essai fraîchement préparées et avant le renouvellement de la solution. Si le volume à analyser est insuffisant, il peut se révéler utile de fusionner les solutions d'essai ou d'avoir recours à des enceintes de substitution fabriquées dans le même matériau et ayant les mêmes rapports du volume à la surface que les plaques à 24 puits. Il est vivement recommandé que les résultats soient basés sur les concentrations mesurées. Si les concentrations s'écartent de 80-120 % de la valeur nominale, il faut exprimer les concentrations avec effet par rapport à la moyenne géométrique des concentrations mesurées dans les essais semi-statiques ; pour de plus amples informations, voir le chapitre 5 du document d'orientation de l'OCDE n° 23 (29).

ESSAI LIMITE

37. Sur la base du mode opératoire décrit dans la présente Ligne directrice, un essai limite peut être conduit à 100 mg/L du produit chimique testé ou jusqu'à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (selon la valeur la plus basse), de façon à démontrer que la CL_{50} est supérieure à cette concentration. On devra placer 20 embryons dans le traitement, le témoin positif et, si nécessaire, le témoin de solvant ainsi que 24 embryons dans le témoin négatif. Si le pourcentage de létalité à la concentration testée dépasse de 10 % la mortalité dans le témoin négatif (ou le témoin de solvant), on doit procéder à une étude complète. Les effets observés doivent être enregistrés. Si la mortalité dépasse 10 % dans le témoin négatif (ou le témoin de solvant), l'essai n'est plus valable et doit être recommencé.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

38. Dans cet essai, chaque puits est considéré comme un réplicat indépendant pour l'analyse statistique. Les pourcentages d'embryons pour lesquels au moins l'une des observations apicales est positive au bout de 48 et/ou 96 h sont représentés graphiquement en fonction des concentrations d'essai. Pour le calcul des pentes de la courbe, des valeurs de la CL_{50} et des limites de confiance (95%), on appliquera les méthodes statistiques appropriées (39) et on consultera le document d'orientation de l'OCDE n° 54 (40).

Rapport d'essai

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

Produit chimique testé:

Substance mono-constituant :

- apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques ;
- identification chimique : nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris la teneur en carbone organique, si cela se justifie).

Substance multi-constituants, UVCBs et mélanges :

- caractérisée, autant que possible p.ex. par l'identité chimique des constituants voir-ci-dessus, la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Organismes d'essai :

- nom scientifique, souche, origine, méthode de collecte des œufs fécondés et manipulations ultérieures.

Conditions d'expérimentation :

- méthode utilisée (par exemple semi-statique/avec renouvellement) ;
- photopériode ;
- protocole de l'essai (nombre d'enceintes d'essai, types de témoins, etc.) ;
- caractéristiques de l'eau pour l'entretien des poissons (pH, dureté, température, conductivité, oxygène dissous, etc.) ;
- concentration d'oxygène dissous, pH, dureté totale, température et conductivité des solutions d'essai au début de l'essai et au bout de 96 h) ;
- méthode de préparation des solutions-mères et des solutions d'essai, ainsi que fréquence du renouvellement ;
- justification de l'emploi d'un solvant et justification de son choix, s'il ne s'agit pas de l'eau ;
- concentrations d'essai nominales et résultat de toutes les analyses visant à déterminer la concentration du produit chimique testé dans les cuves d'essai ; on notera également dans le rapport le rendement de récupération de la méthode et sa limite de quantification (LQ) ;
- preuve que les témoins ont répondu aux critères de validité applicables au taux global de survie ;
- taux de fécondation des œufs ;

- taux d'éclosion dans les groupes de traitement et les groupes témoins.

Résultats :

- la plus forte concentration ne provoquant aucune mortalité durant l'essai ;
- la plus faible concentration provoquant 100 % de mortalité durant l'essai ;
- la mortalité cumulée pour chaque concentration aux moments d'observation recommandés ;
- les valeurs de la CL₅₀ à 96 h (éventuellement à 48 h) en ce qui concerne la mortalité, avec des intervalles de confiance de 95 %, si possible ;
- un graphique représentant la courbe concentration-mortalité à la fin de l'essai ;
- la mortalité dans les témoins (témoins négatifs, témoins à l'intérieur d'une plaque, témoin positif et, le cas échéant, témoin de solvant) ;
- les données sur le résultat de chacune des quatre observations apicales ;
- l'incidence et la description des anomalies morphologiques et physiologiques, s'il y a lieu (voir les exemples de la figure 2, annexe 5) ;
- les incidents survenus au cours de l'essai et qui ont pu influencer sur les résultats ;
- l'analyse statistique et le traitement des données (analyse probit, modèle de régression logistique et moyenne géométrique des valeurs de la CL₅₀) ;
- la pente et les limites de confiance du modèle de régression de la courbe concentration-réponse (transformée).

Écarts éventuels par rapport à la présente Ligne directrice et explications correspondantes.

Discussion et interprétation des résultats.

BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2011) Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Série de l'OCDE sur les essais et évaluations n° 157, OCDE, Paris.
2. OCDE (2012) Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (annexes). Série de l'OCDE sur les essais et évaluations n° 179, OCDE, Paris.
3. Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. et Seitz, N. (2005) ,Towards an alternative for the acute fish CL50 test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - an update. ALTEX 22: 87-102.
4. ISO (2007), Qualité de l'eau -- Détermination de la toxicité aiguë des eaux résiduaires vis-à-vis des œufs de poisson-zèbre (*Danio rerio*). ISO 15088:2007, Organisation internationale de normalisation.
5. Nagel, R. (2002), DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) - a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.
6. Schulte, C. and Nagel, R. (1994), Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test - preliminary results. ATLA 22, 12-19.

7. Bachmann, J. (2002), Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Allemagne.
8. Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. et Nagel, R. (1995), Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. *Chemosphere* 30/11: 2087-2102.
9. Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012), Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9690-9700.
10. Kammann, U., Vobach, M. et Wosniok, W. (2006), Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51:97-102.
11. Groth, G., Kronauer, K. et Freundt, K.J. (1994), Effects of *N,N*-diethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. *Toxicol. In Vitro* 8: 401-406.
12. Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. et Freundt, K.J. (1993), Toxicity studies in fertilized zebrafish fish oeuvs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 878-882.
13. Nguyen, L.T. et Janssen, C.R. (2001), Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* 16: 566-71.
14. Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. et Wu, R.S.S. (2000), Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 3024-3031.
15. Belanger, S. E., Rawlings J. M. et Carr G. J., Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* (Accepted).
16. Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009), Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*: 149 (2), 196-209
17. OCDE (1992), Essai n° 301: Biodégradabilité Facile, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
18. Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011), Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology* 281: 25-36.
19. Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012), Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Reprod. Toxicol.* 33: 133-141.
20. Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011), Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 257: 242-249.
21. Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011), Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253: 244-252.
22. Henn, K., Braunbeck, T. (2011), Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol.* 153C: 91-98.
23. OCDE (2009), Essai n° 229 : Essai à court terme de reproduction des poissons, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris. Voir Annexe 4a.

24. Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009), Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. In Vitro* 23: 1436-1442.
25. Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4097-4102.
26. Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008), How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1676-1682.
27. ISO (Organisation internationale de normalisation) (1996), Qualité de l'eau -- Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Téléostei, Cyprinidae)] -- Partie 3: Méthode avec renouvellement continu. [<http://www.iso.org>].
28. OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Série sur les essais et l'évaluation n° 23, ENV/JM/MONO8200)6, OCDE, Paris.
29. Laale, H.W. (1977), The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 10: 121-173.
30. Westerfield, M. (2000), The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5^{ème} édition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.
31. Conseil canadien de protection des animaux (2005), Lignes directrices du CCPA sur : le soin et l'utilisation des poissons en recherche, en enseignement et dans les tests, ISBN: 0-919087-43-4 [http://www.ccac.ca/Documents/Normes/Lignes_directrices/Poissons.pdf]
32. Commission européenne (2007), Recommandation de la Commission du 18 juin 2007 concernant des lignes directrices relatives à l'hébergement et aux soins des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (notifiée sous le numéro C(2007) 2525) (2007/526/CE) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:FR:PDF>]
33. Union européenne (2010), Directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Journal officiel de l'Union européenne, L 276:33-79; 20.10.2010 [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:FR:PDF>]
34. Nagel, R. (1986), Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). *J. Appl. Ichthyol.* 2: 173-181.
35. Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. et Schilling, T.F. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
36. OCDE (2004), Essai n° 202: *Daphnia* sp., essai d'immobilisation immédiate. Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
37. Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009), Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test. *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1970-1978
38. ISO (Organisation internationale de normalisation) (2006), Qualité de l'eau -- Lignes directrices relatives à l'interprétation statistique de données écotoxicologiques. Available: [<http://www.iso.org>].
39. OCDE (2006) Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Série sur les essais et l'évaluation, n° 54, OCDE, Paris.

ANNEXE 1

DÉFINITIONS

Effet apical : ayant des effets au niveau de la population.

Blastula : formation cellulaire autour du pôle animal, qui recouvre une certaine partie du vitellus.

Épibolie : prolifération massive de cellules principalement épidermiques lors de la phase de gastrulation de l'embryon et mouvement de ces cellules de la face dorsale vers la face ventrale, par lequel les couches de cellules entodermiques s'invaginent et le vitellus se retrouve à l'intérieur de l'embryon.

Essai dynamique : essai avec un flux continu de solutions d'essai dans le système d'essai pendant toute la durée de l'exposition.

Témoin à l'intérieur d'une plaque : témoin interne constitué de quatre puits remplis d'eau de dilution par plaque à 24 puits afin d'identifier la contamination potentielle des plaques par le fabricant ou par le chercheur au cours du protocole, et tout effet de la plaque pouvant influencer sur le résultat de l'essai (gradient de température, par exemple).

Eau d'entretien : eau dans laquelle est pratiqué l'élevage des poissons adultes.

Concentration létale médiane (CL₅₀) : concentration d'une substance d'essai qui devrait provoquer la mort de 50 % des animaux exposés au cours de l'essai.

Essai semi-statique (essai avec renouvellement) : essai avec renouvellement régulier des solutions d'essai à l'issue de périodes définies (toutes les 24 h, par exemple).

Somite : chez les vertébrés au stade de développement embryonnaire, les somites sont des masses mésodermiques situées de part et d'autre du tube neural, qui produiront ensuite le derme (dermatome), les muscles squelettiques (myotome) et les vertèbres (sclérotome).

Essai statique : essai dans lequel les solutions d'essai restent inchangées pendant toute la durée de l'essai.

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

SMILES : Spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée

IUPAC : Union internationale pour la chimie pure et appliquée.

ANNEXE 2ENTRETIEN, ÉLEVAGE ET CONDITIONS TYPES POUR LES ESSAIS DE TOXICITÉ
AIGÛES SUR EMBRYONS DE POISSON-ZÈBRE

Poisson-zèbre (<i>Danio rerio</i>)		
Origine de l'espèce	Inde, Birmanie, Malacca, Sumatra	
Dimorphisme sexuel	Femelles : ventre proéminent lorsqu'elles portent des œufs Mâles : plus sveltes, teinte orangée entre les rayures bleues longitudinales (particulièrement visible sur la nageoire anale)	
Régime alimentaire	Flocons déshydratés (max. 3 % du poids des poissons par jour) 3-5 fois par jour + nauplies d'artémies (du genre <i>Artemia</i>) et/ou daphnies de taille appropriée provenant d'une source non contaminée. Les petits crustacés sont une source d'enrichissement de l'environnement et doivent donc faire partie du régime alimentaire, si possible. Pour une qualité de l'eau optimale, les aliments non consommés et les fécès doivent être retirés une heure environ après le repas.	
Poids approximatif des poissons adultes	Femelles : 0.65±0.13 g Mâles : 0.5±0.1 g	
Entretien des poissons parentaux	Intensité de l'éclairage	Ampoules fluorescentes (à large spectre) ; 10-20 µE/m ² /s, 540-1080 lux ou 50-100 fc (niveaux ambiants du laboratoire) ; photopériode : 12-16 h
	Température de l'eau	26±1 °C
	Qualité de l'eau	O ₂ ≥80 % de la valeur de saturation, dureté : par exemple, ~ 30-300 mg/L de CaCO ₃ , NO ₃ ⁻ : ≤48mg/L, NH ₄ ⁺ et NO ₂ ⁻ : <0.001 mg/L, chlore résiduel <10 µg/L, chlore organique total <25 ng/L, pH = 6.5-8.5
	Autres critères de qualité de l'eau	Particules <20 mg/L, carbone organique total <2 mg/L, pesticides organophosphorés totaux <50 ng/L, pesticides organochlorés totaux et biphényles polychlorés <50 ng/L
	Contenance des cuves d'entretien	180 L, 1 poisson/L, par exemple
	Purification de l'eau	Permanente (avec filtres à charbon) ; autres possibilités : combinaisons avec un système d'entretien avec renouvellement semi-statique ou avec un système dynamique avec renouvellement de l'eau en continu
Rapport mâles/femelles recommandé pour l'élevage	2:1 (ou frai de masse)	

Cuves de frai	Par exemple, cuves de 4 L avec fond grillagé en acier et plantes artificielles servant de stimulant pour le frai ; coussins chauffants extérieurs, ou frai de masse à l'intérieur des cuves d'entretien.
Structure et apparence des œufs	Chorion stable (soit très transparent, non collant, diamètre d'environ 0.8-1.5 mm)
Taux de frai	Une femelle à maturité fraie au moins 50-80 œufs par jour. Chez certaines souches, les taux de frai peuvent être beaucoup plus élevés. Le taux de fécondation doit être ≥ 70 %. Dans le cas de poissons frayant pour la première fois, les taux de fécondation des œufs peuvent être plus faibles lors des premiers frais.
Type d'essai	Statique, semi-statique avec renouvellement, dynamique, 26 ± 1 °C, enceintes d'essai conditionnées pendant 24 h (plaques à 24 puits avec des cavités de 2.5-5 mL, par exemple)

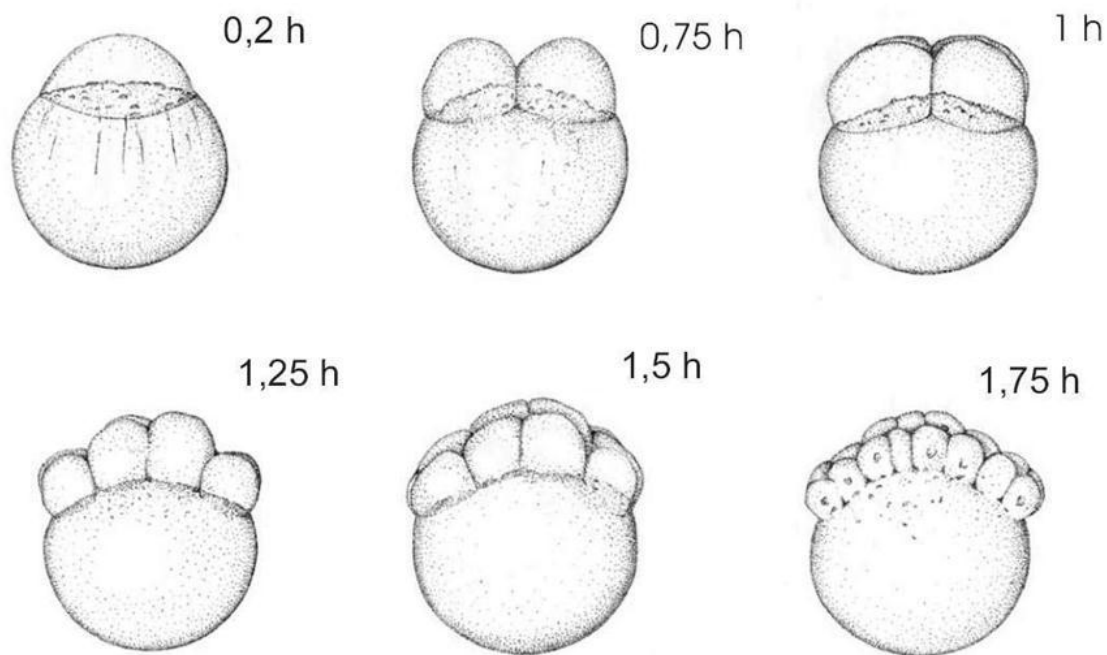
ANNEXE 3DÉVELOPPEMENT NORMAL DU POISSON-ZÈBRE À 26°C

Figure 1 : **Sélection de premiers stades de développement du poisson-zèbre (*Danio rerio*)** : 0.2–1.75 h après la fécondation (Kimmel *et al.*, 1995). On peut utiliser la succession dans le temps des différents stades de développement normal pour diagnostiquer à la fois la fécondation et la viabilité des œufs (voir le paragraphe 25 : Sélection des œufs fécondés).

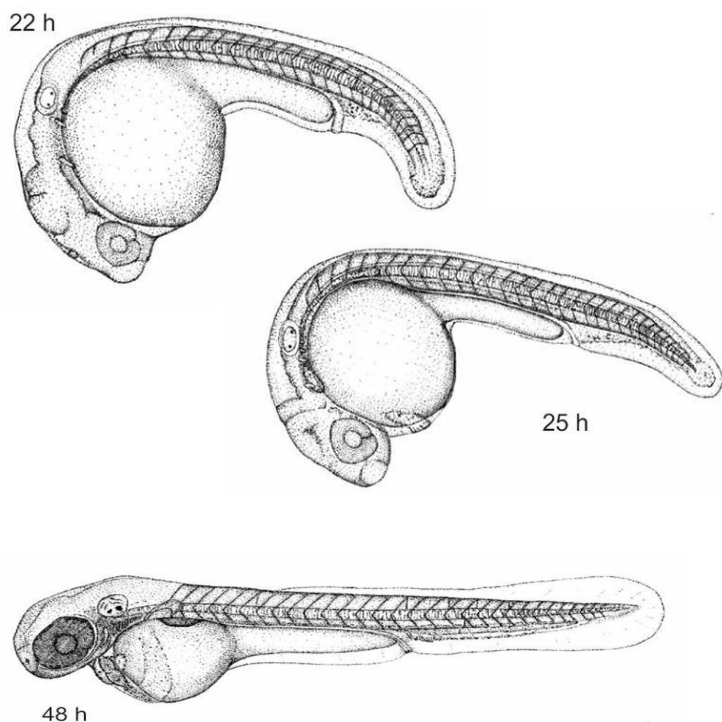


Fig. 2 : **Sélection de derniers stades de développement du poisson-zèbre (*Danio rerio*)** (embryon déchorioné pour une meilleure visibilité) : 22–48 h après la fécondation (Kimmel *et al.*, 1995).

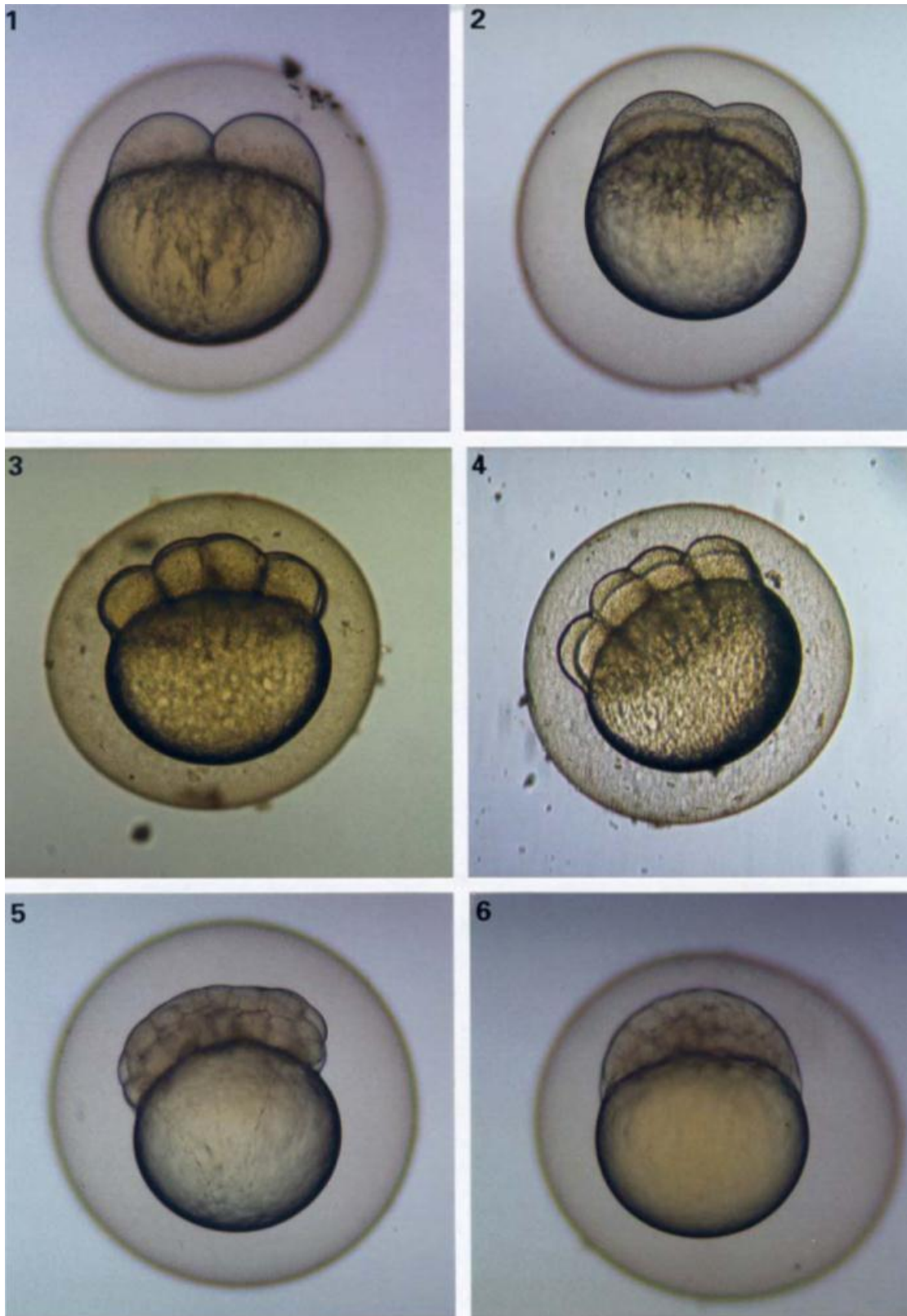
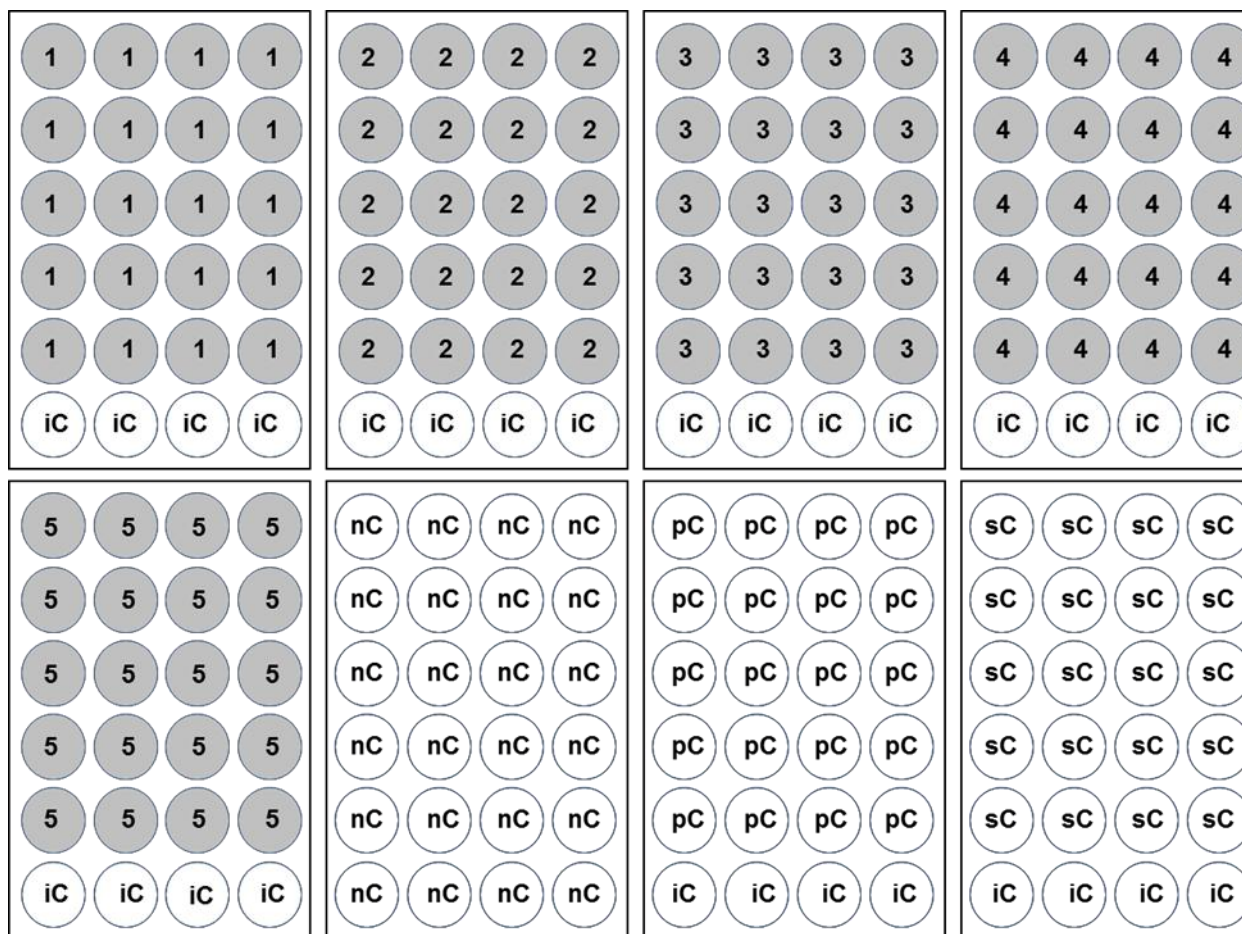


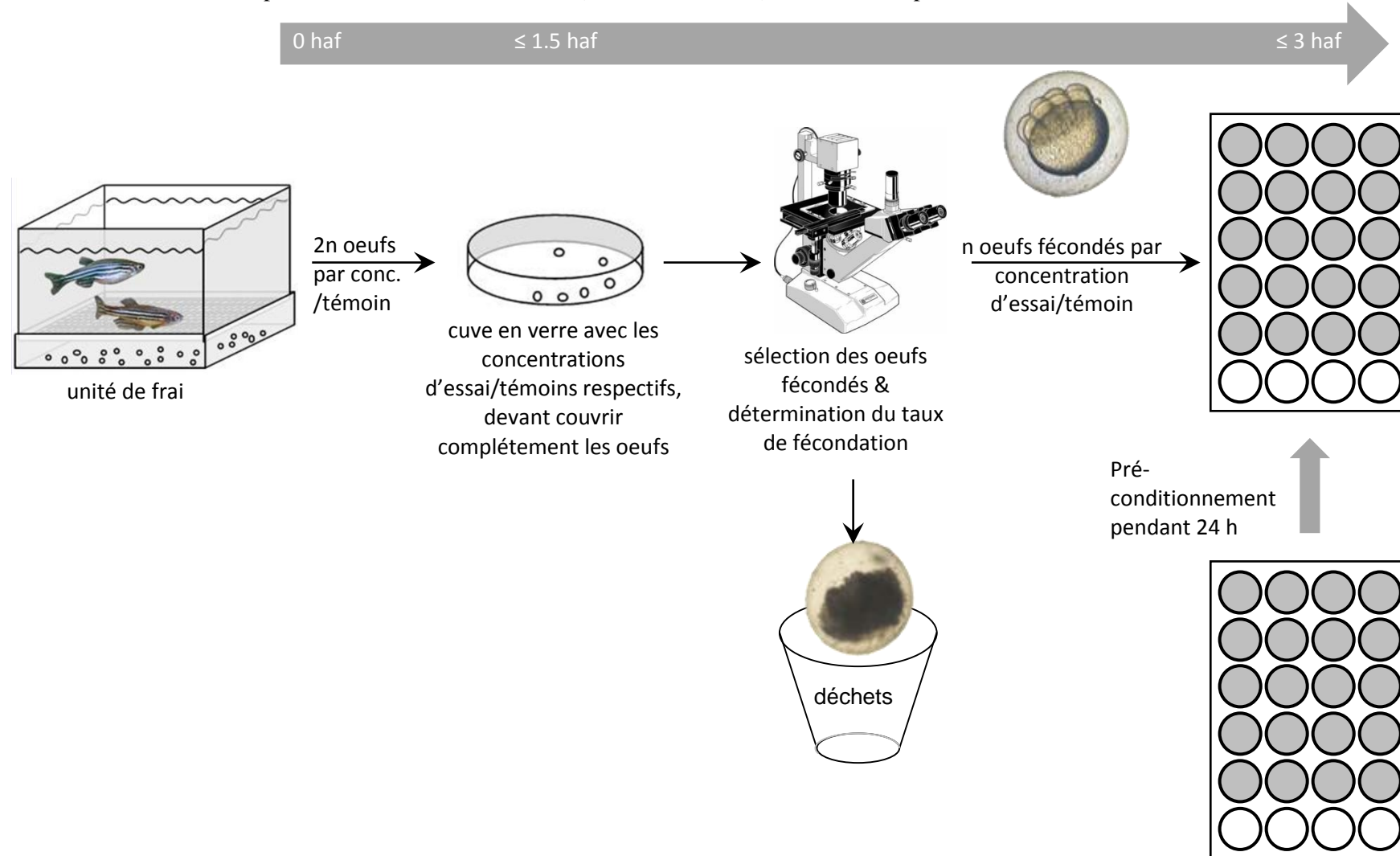
Figure 3 : Développement normal d'un poisson-zèbre (*Danio rerio*) au stade embryonnaire : (1) 0.75 h, stade à 2 cellules ; (2) 1 h, stade à 4 cellules ; (3) 1.2 h, stade à 8 cellules ; (4) 1.5 h, stade à 16 cellules ; (5) 4.7 h, début de l'épibolie ; (6) 5.3 h, épibolie à 50 % environ (Braunbeck & Lammer 2005).

Figure 1: Plan des plaques à 24 puits



1-5 = cinq concentrations d'essai / substance ; nC = témoin négatif (eau de dilution) ; iC = témoin à l'intérieur d'une plaque (eau de dilution) ;
pC = témoin positif (3,4-DCA : 4 mg/L) ; sC = témoin de solvant

Figure 2 : **Schéma du protocole des essais de toxicité chez le poisson-zèbre au stade embryonnaire (de gauche à droite)** : production d'œufs, collecte des œufs, pré-exposition immédiatement après la fécondation dans des cuves en verre, sélection des œufs fécondés au moyen d'un microscope inversé ou binoculaire et répartition des œufs fécondés sur des plaques à 24 puits préparées avec les concentrations d'essai/témoins respectifs, n = nombre d'œufs nécessaire par concentration d'essai/témoin (20 en l'occurrence), haf = heures après fécondation.



ANNEXE 5ATLAS DES PARAMÈTRES LÉTAUX POUR L'ESSAI DE TOXICITÉ CHEZ LE POISSON-ZÈBRE AU STADE EMBRYONNAIRE

Les paramètres apicaux ci-dessous donnent des indications sur la toxicité aiguë et, par conséquent, la mort des embryons : *coagulation de l'embryon, non-détachement de la queue, absence de formation de somites et absence de détection de battements du cœur*. Les micrographies ci-dessous ont été sélectionnées pour illustrer ces paramètres.

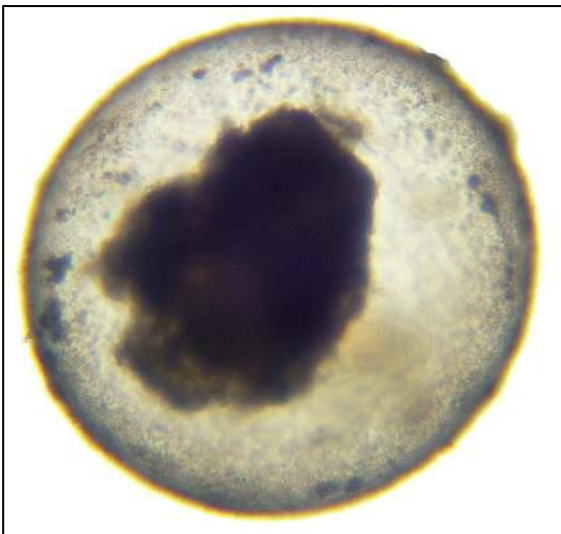


Figure 1 : **Coagulation de l'embryon** : Par éclairage sur fond clair, on distingue diverses inclusions opaques sur les embryons de poisson-zèbre coagulés.

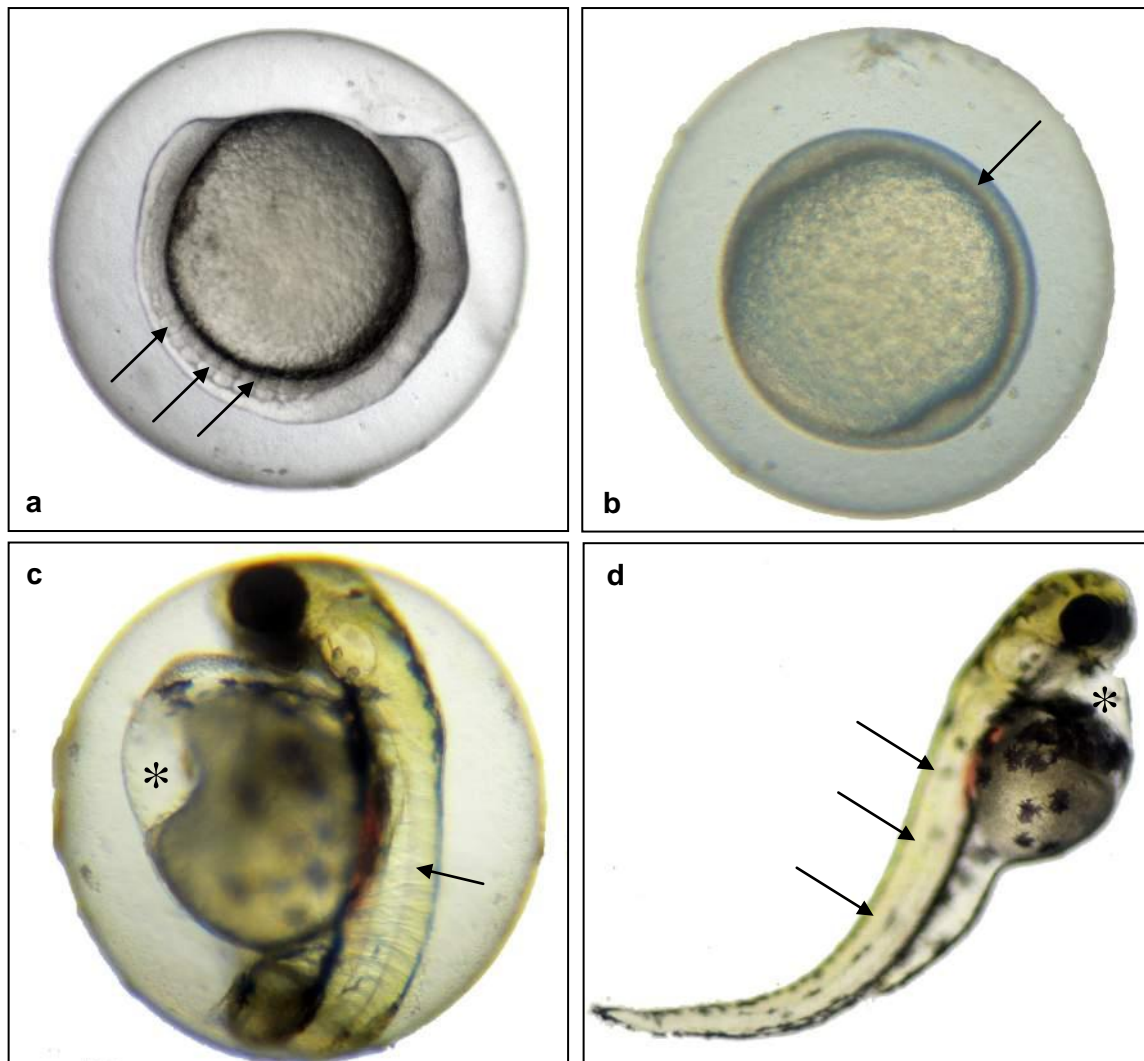


Figure 2 : **Absence de formation de somites** : Malgré un retard de développement de 10 h environ, l'embryon de poisson-zèbre de 24 h a des somites bien développées (→) en (a) tandis qu'il ne montre aucun signe de formation de somites (→) en (b). On observe la formation de somites bien distinctes (→) chez l'embryon de poisson-zèbre de 48 h en (c) malgré un œdème prononcé du sac vitellin (*) tandis qu'en (d) l'embryon de poisson-zèbre de 96 h ne montre aucun signe de formation de somites (→). On note également la déviation de la colonne vertébrale (scoliose) et l'œdème péricardique (*) chez l'embryon en (d).



Figure 3: Vue latérale du **non-détachement du bourgeon caudal** (a : → ; embryon de poisson-zèbre de 96 h). On note également l'absence de vésicule optique (*).

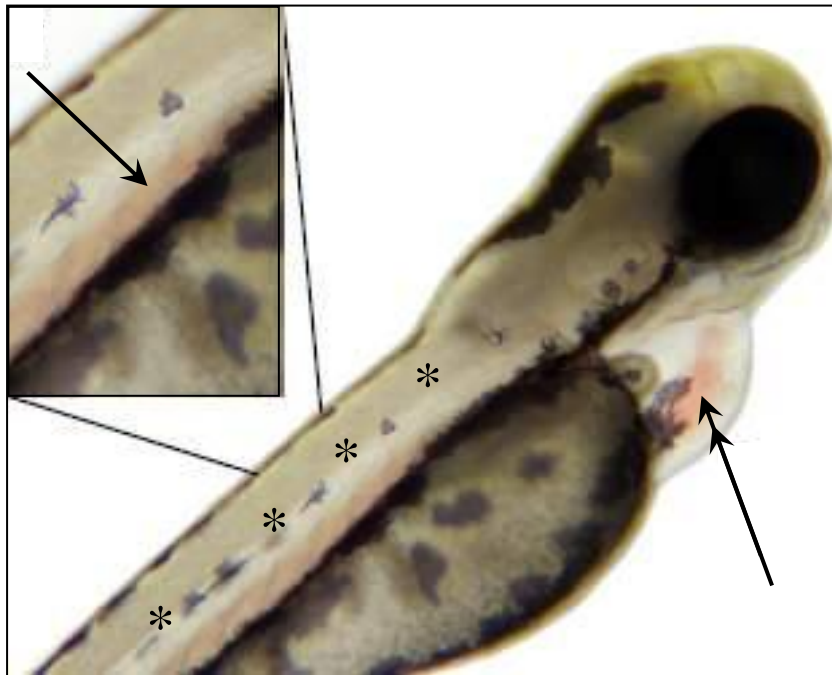


Figure 4: L'absence de battements du cœur est, par définition, difficile à illustrer au moyen d'une micrographie. La non-convulsion du cœur (double flèche) indique l'absence de battements du cœur. L'immobilité des cellules sanguines, par exemple dans l'aorte abdominale (→ dans l'encadré) n'est pas un indicateur d'absence de battements du cœur. On notera également l'absence de formation de somites dans cet embryon (*, apparence homogène plutôt que segmentaire des tissus musculaires). L'observation pour l'enregistrement d'une absence de battements du cœur doit durer au moins une minute, avec un grossissement supérieur ou égal à 80×.