



**Caractérisation du développement
embryo-larvaire chez le poisson
zèbre (*Danio rerio*) et comparaison
des tests de toxicité aiguë sur les
stades embryo-larvaire et adulte**

Rapport technique

Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable
Direction de l'Eau
20, avenue de Ségur – 75302 PARIS 07 SP

Convention DE n° CV03000081 - Opération n°1

Jean-Marc PORCHER, Claire DELAHAYE, Dominique HERVIN,
François BRION, Véronique POULSEN

*Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques
Direction des Risques Chroniques*

23 DÉCEMBRE 2003

Caractérisation du développement embryo-larvaire chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) et comparaison des tests de toxicité aiguë sur les stades embryo-larvaire et adulte

23 DÉCEMBRE 2003

PERSONNES AYANT PARTICIPE A L'ETUDE

Jean-Marc PORCHER, Claire DELAHAYE, Dominique HERVIN,
François BRION, Véronique POULSEN

Ce document comporte 18 pages (hors couverture et annexes).

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	J-M. PORCHER	V. POULSEN	E. THYBAUD
Qualité	Ingénieur de la DRC – Unité ECOT	Ingénieurs de la DRC – Unité ECOT	Responsable de l'unité ECOT
Visa			

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION & OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	2
2. MATÉRIEL & MÉTHODES.....	3
2.1 Modèle expérimental	3
2.2 Choix des substances testées	3
2.3 Tests de toxicité aiguë sur poisson zèbre adulte : détermination des CL50 (96h)	3
2.4 Suivi du développement embryo-larvaire du poisson zèbre	5
2.5 Tests de toxicité sur œufs de poissons zèbre.....	5
3. RÉSULTATS & DISCUSSION.....	6
3.1 Suivi du développement embryo-larvaire du poisson zèbre	6
3.2 Tests de toxicité sur poissons zèbres adultes : CL50 (96h) <i>in vivo</i>	9
3.3 Tests de toxicité aiguë sur œufs de poissons zèbres : CL50 <i>in vitro</i>	11
4. CONCLUSION	15
5. BIBLIOGRAPHIE.....	16
6. LISTE DES ANNEXES	17

1. INTRODUCTION & OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les poissons font partie des modèles expérimentaux les plus utilisés en écotoxicologie dans le cadre de l'évaluation des dangers des substances chimiques. Depuis quelques années l'opinion publique exerce une pression importante sur les pouvoirs publics et les industriels afin de limiter l'expérimentation animale. Ce phénomène a provoqué un intérêt croissant pour le développement de méthodes d'expérimentation dites « alternatives ».

Le remplacement de tests sur les adultes par des tests sur œufs pourrait permettre de réduire le nombre de poissons utilisés pour les essais de toxicité, de diminuer leur coût et d'augmenter la rapidité de ces études.

Différentes espèces sont couramment utilisées pour l'évaluation de la toxicité aiguë des substances dont le poisson zèbre (*Danio rerio*). A l'heure actuelle, des tests alternatifs de toxicité aiguë sur les stades embryo-larvaires de ces modèles expérimentaux ont été développés, mais ils doivent encore être standardisés et validés avant de pouvoir être utilisés en substitut des tests réglementaires. En particulier, la sensibilité et la spécificité vis-à-vis des produits toxiques testés doivent être précisées.

L'objectif de l'étude est de comparer les résultats de toxicité aiguë obtenus sur des poissons adultes avec ceux obtenus sur des œufs en 24 heures.

Les travaux ont été divisés en différentes parties :

Dans un premier temps une étude du développement embryo-larvaire du poisson zèbre a été entreprise sur des œufs témoins (observation des malformations, de la mortalité, de la chronologie du développement). Un test de toxicité aiguë sur les œufs de poisson zèbre a ensuite été mis en place.

Parallèlement, des tests de toxicité aiguë sur poisson zèbre ont été réalisés dans le but de déterminer les concentrations létales à 50% (CL50) à 96h pour les différents produits retenus dans l'étude.

La dernière partie de l'étude a consisté à réaliser les tests de toxicité aiguë sur les œufs afin de déterminer les concentrations toxiques des différentes substances sélectionnées et à comparer les résultats avec ceux obtenus *in vivo* sur poissons adultes.

2. MATERIEL & METHODES

2.1 MODELE EXPERIMENTAL

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un des modèles le mieux adapté pour établir une comparaison entre la sensibilité des adultes et celle des stades embryo-larvaires vis à vis des produits toxiques en raison de son développement rapide.

C'est un poisson d'eau douce appartenant à la classe des poissons osseux de la famille des Cyprinidés. Il mesure jusqu'à 45 mm de long et pèse environ 300 mg. On peut donc aisément élever un grand nombre de poissons zèbres dans un volume d'eau restreint. Les femelles ont un abdomen plus gonflé que les mâles et sont reconnaissables à leur papille urogénitale. Elles pondent des œufs transparents non collants qui sont très perméables.

La ponte s'effectue dans les 30 minutes après le début de l'illumination de la pièce où ils sont élevés avec un rapport optimal mâle/femelle de 2/1 (Meyer 1993). Une seule femelle mature peut pondre de 50 à 200 œufs par jour, ce qui permet de réaliser un très grand nombre de tests.

D'autre part, le développement embryo-larvaire du poisson zèbre est très bien décrit dans de nombreuses études, et permet une interprétation facile des effets des produits toxiques. De plus, il est très rapide, l'éclosion des œufs a lieu 4 à 5 jours après la ponte (Laale 1997).

Les tests de toxicité sur ces stades sont donc très rapides.

2.2 CHOIX DES SUBSTANCES TESTEES

Dans un premier temps, une trentaine de substances ont été sélectionnées pour cette étude. Tout d'abord, on a choisi de tester dix polymères solubles pour lesquels les tests de toxicité aiguë ont donné une mauvaise corrélation entre les CL 50 (96h) adulte et embryo-larvaire chez le medaka du fait que ces substances ne pénètrent pas dans les œufs de medaka. On a ensuite choisi 10 tensioactifs. Enfin, 10 substances ont été sélectionnées en raison de leur toxicité plus importante sur poisson par rapport aux autres espèces utilisées en écotoxicologie pour les dossiers d'étiquetage des substances chimiques (algues et daphnies).

2.3 TESTS DE TOXICITE AIGUË SUR POISSON ZEBRE ADULTE : DETERMINATION DES CL50 (96H)

2.3.1 Stabulation des poissons adultes pour les tests de toxicité aiguës

Tous les poissons zèbres utilisés pour les tests proviennent du même fournisseur (Dourdan Exotique).

Les poissons utilisés sont stockés dans deux bacs de stabulation de 400 litres contenant de l'eau reconstituée d'après la norme NF EN iso 7346. On la produit en diluant dans de l'eau déminéralisée, les sels suivants :

CaCl ₂ , 2H ₂ O	294.0 mg/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O	123.3 mg/L
NaHCO ₃	63.0 mg/L
KCL	5.5 mg/L

Les deux bacs de stabulation sont maintenus à une température comprise entre 22 et 26°C grâce à un système de climatisation.

Pour l'éclairage, on utilise deux lampes à néon réglées par une minuterie sur un temps d'exposition à la lumière de 12h par jour. Les bacs sont oxygénés grâce à des bulleurs qui maintiennent la concentration en O₂ au dessus de 60% de la valeur de la saturation de l'air.

Les bacs sont équipés de pompes filtrantes EHEIM (230V, 50Hz, 8 W, 440L/h).

Les paramètres physico-chimiques de l'eau (pH, O₂, conductimétrie) sont relevés quotidiennement.

On nourrit les poissons quotidiennement avec de la nourriture sèche (Tétramin® pro), jusqu'à 24h avant le début de l'essai.

2.3.2 Critères de validité du lot

Les poissons doivent rester dans les bacs de stabulation au minimum 12 jours avant le début de l'essai (norme ISO NF EN 7346). Pendant cette période, on observe la mortalité de la population du bac. Si elle est supérieure à 10%, on ne peut pas utiliser ce lot pour l'essai.

Si la mortalité est comprise entre 5 et 10% de la population du bac, on prolonge d'au moins 7 jours la période de stabilisation-observation.

Enfin, si la mortalité est inférieure à 5% de la population du bac, le lot est accepté pour l'essai.

Ensuite, on vérifie la sensibilité du lot de poissons. Pour cela, on réalise un test avec le dichromate de potassium K₂Cr₂O₇ (substance de référence) sur 24H dans les mêmes conditions d'essai (voir ci-dessous). On prépare une solution mère de 25g/L et une gamme de concentrations : 120-156-203-264-343-446 mg/L.

La CL 50 (24h) du dichromate de potassium doit se situer entre 200 et 400 mg/L pour que le lot soit accepté pour l'essai (d'après les données historiques du laboratoire).

Enfin, on contrôle le calibrage des poissons selon la norme ISO NF EN 7346. A partir du lot de stabulation, on prélève au hasard un échantillon de 30 poissons.

Ils sont essuyés rapidement, mesurés à la règle graduée et pesés.

La longueur moyenne doit être de 30 ± 5 mm et le poids humide moyen égal à 0,3 ± 0,15 g.

2.3.3 Test de toxicité aiguë sur poissons zèbres adultes

Les tests de toxicités aiguës sur Poisson zèbre se déroulent pendant 96h dans une salle climatisée à 23-25° où se situent 2 étagères sur lesquelles sont placés 21 bacs de 4L et d'un dispositif d'aération permettant de maintenir une teneur en O₂ supérieure à 60% de la valeur de la saturation de l'air dans chaque bac.

On relève les paramètres physico-chimiques de l'eau (pH, O₂, conductimétrie) toutes les 24 heures et un thermo-enregistreur est placé dans la pièce.

Pour chaque produit testé, on réalise une solution mère en diluant le produit pur dans de l'eau ISO. On réalise les gammes de concentration des substances testées par rapport aux CL 50 obtenues dans la littérature. On prépare, directement dans les bacs, une gamme de 5

dilutions, espacées d'un pas de 2, de sorte que la CL50 estimée soit en milieu de gamme. On complète avec de l'eau ISO jusqu'à 4L puis l'on place 10 poissons dans chaque bac.

Un bac témoin de 10 poissons dans de l'eau ISO est mis en place pour l'ensemble des produits testés le même jour.

Les poissons sont examinés après 24, 78, 72, et 96h. A chaque observation, on compte le nombre de morts dans chaque bac. On relève les valeurs du pH et de l'oxygène dissous de chaque bac après avoir vérifié le bon fonctionnement de chaque appareil.

Les données sont traitées dans une feuille de calcul Excel grâce à une macro commandée développée par M. Eric Vindimian (Regtox-ev 6.6.2).

2.4 SUIVI DU DEVELOPPEMENT EMBRYO-LARVAIRE DU POISSON ZEBRE

Les œufs de poisson zèbre proviennent de l'élevage mis en place à l'INERIS.

Les bacs de reproduction ont un volume de 15L et reposent dans un bain-marie à une température de 27°C. Ils sont alimentés en continu par de l'eau du réseau traitée par filtration et osmose dont le pH est de $7,5 \pm 1$, la teneur en O₂ est de 6mg/l ± 1 et la conductivité est de 300 μ S/cm.

Les œufs sont recueillis une demi-heure après l'illumination de la pièce grâce à un récipient qui repose au fond de chaque bac et qui est recouvert sur la partie supérieure d'un grillage en nylon vert. Ce système permet aux œufs de tomber au fond du récipient et de les conserver à l'abri des adultes. De plus il limite le nombre de manipulations des œufs qui sont très sensibles aux mouvements.

Les œufs sont ensuite placés dans une boîte de pétri de 10 mL rempli d'eau iso stérilisée.

Nous avons compté le nombre d'anomalies de croissance et de division cellulaire, ainsi que le nombre de morts. Les embryons morts ont été enlevés immédiatement de la boîte de pétri.

Des clichés des œufs ont été pris à l'aide d'un microscope olympus SZX12 équipé d'une caméra numérique et piloté par un logiciel d'analyse d'images (microvision instrument). Ces photos ont été prises tous les quart d'heure. A chaque observation on a déterminé s'il n'y avait pas de retard dans le développement embryo-larvaire (cf. annexe 1).

2.5 TESTS DE TOXICITE SUR ŒUFS DE POISSONS ZEBRE

Les œufs sont récupérés selon la méthode décrite ci-dessus. Ils sont traités par de l'eau de javel à 0,03% pendant 10 minutes, puis rincés deux fois pendant deux minutes avec de l'eau ISO. Les tests sont réalisés dans des plaques de culture cellulaire de 6 puits contenant 10 ml de milieu. On dépose 10 œufs fécondés par puits. Les plaques sont mises à l'étuve à 27°C.

Le test est réalisé sur des œufs fécondés le jour même. A la fin du test on note le nombre d'embryons morts et anormaux.

Des tests préliminaires de toxicité ont été réalisés avec les produits testés sur poissons zèbre adultes. Pour chaque produit, la gamme de concentration testée est : 0-1-10-100-1000 mg/L. On produit cette gamme à l'aide d'une solution mère de concentration 1000 mg/L en diluant le produit pur dans de l'eau ISO. Le test se déroule sur 48 heures. Toutes les 24 heures, on relève le nombre de morts, et le nombre d'œufs anormaux.

Un test « définitif » est ensuite effectué sur une gamme de concentrations plus étroite en utilisant un pas de dilution de 2. On détermine alors les CL50 (48h) des produits testés.

3. RESULTATS & DISCUSSION

3.1 SUIVI DU DEVELOPPEMENT EMBRYO-LARVAIRE DU POISSON ZEBRE

3.1.1 Développement normal

Des photos des œufs provenant de l'élevage de l'INERIS ont été prises tous les quarts d'heure. Ce suivi a permis de caractériser leur développement à l'état normal (Figure 1 et Annexe 1)

Le développement embryo-larvaire du poisson zèbre est très rapide. Il est divisé en huit périodes fondamentales constituées chacune de plusieurs stades.

Il y a tout d'abord, à $t = 0h$, la période "zygote" ou une cellule. L'œuf vient d'être fertilisé, les mouvements cellulaires sont activés et le cytoplasme migre vers le pôle animal.

Trois quarts d'heure après la fertilisation, la période de division commence. Seul le dôme de blastoderme entre en division. L'œuf passe de 2 à 64 cellules par des divisions rapides et synchrones.

La période de blastula commence à $t = 2h15$, l'embryon est alors constitué de 128 cellules. Le dôme de cellules de blastoderme occupe la moitié de la hauteur du sac vitellin. La division du blastoderme continue, jusqu'à former plus de 1000 cellules. La blastula change ensuite de forme. Dans un premier temps, elle s'allonge, puis l'axe pôle animal-pôle végétal se raccourcit, elle retrouve alors une forme sphérique.

A ce stade, des cellules du sac vitellin (I-YSL) s'enfoncent dans le blastoderme en direction du pôle animal et forment un dôme. A la fin de la période de la blastula, le blastoderme recouvre la cellule vitelline sur 30% de son diamètre.

Lorsqu'il la recouvre à 50%, il s'agit de la période de la gastrula ($t = 5h15$). Cette période est marquée par le début des mouvements morphogénétiques d'involution, d'extension, et par le développement de l'orientation de l'axe dorso-ventral.

Au stade "germ ring", on peut distinguer, du pôle animal, un anneau de blastoderme d'épaisseur uniforme. Puis, au stade "shield", le "bouclier embryonnaire" apparaît et marque l'éventuel côté dorsal de l'embryon. Les cellules du pôle animal donnant les structures de la tête, on peut alors déterminer les axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Les rudiments de la queue, du tube neural et du cerveau sont visibles au stade "bud stage".

La période de la segmentation a lieu à partir de $t = 10 h$. Les somites, les arcs pharyngés primordiaux et les neuromères se développent. Les premiers mouvements apparaissent. La queue se détache au fur et à mesure et croît.

La période de la pharyngula ($t = 24 h$) est marquée par le début de la pigmentation de la rétine et de la peau. La circulation du sang se met en place : le cœur commence à battre et on peut voir des cellules sanguines en mouvement. Des contractions musculaires brusques sont très fréquentes (8 par minute). Les nageoires pectorales commencent à se développer.

La fin de cette période correspond au stade “ high pec ”. On distingue alors très nettement une bande dorsale de pigment ainsi que les prémices d’une bande latérale.

La période de l’éclosion commence à $t = 48$ h. Elle est constituée de trois stades : “ long pec ” ($t = 48$ h), “ pec fin ” ($t = 60$ h), et “ protruding mouth ” ($t = 72$ h). Pendant cette période, la fin de la morphogénèse des organes primaires a lieu. Les cartilages de la tête et des nageoires pectorales se développent. La nageoire pectorale s’allonge postérieurement et commence à recouvrir le sac vitellin. La pigmentation est très importante, les bandes dorsale et ventrales se rencontrent au niveau de la queue. Les mouvements spontanés disparaissent. La bouche est grande ouverte mais pas béante. Elle se situe en dessous de la limite antérieure des yeux. Le cœur bat très fort et est plein de sang circulant. En général, l’éclosion n’a lieu qu’à partir du stade “ protruding mouth ”.

La période “ early larva ” est atteinte à $t = 120$ h. Trois jours après l’éclosion, la larve a pratiquement achevé sa morphogénèse et elle continue à grandir. Il y a un accroissement de la vessie natatoire et la bouche sort de plus en plus vers l’avant dans l’axe antéro-dorsal. Certaines bandes de pigments s’assombrissent pendant que d’autres s’éclaircissent. La larve commence à nager activement et bouge ses mâchoires, ses nageoires pectorales et ses yeux. Ces développements permettent des réponses rapides à des stimuli par la fuite, et annoncent la respiration, la recherche de proies et l’alimentation.

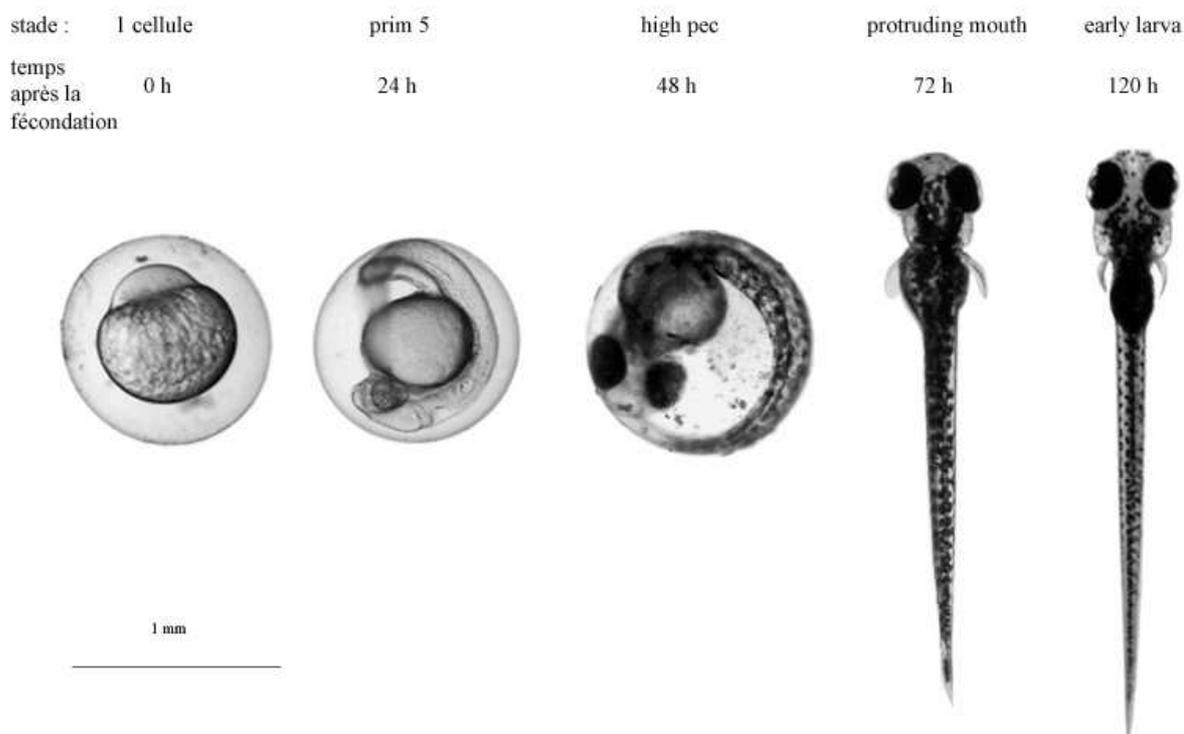


Figure 1 : Principales étapes de développement embryonnaire et larvaire du poisson zèbre.

Enfin, on a constaté que le développement embryonnaire-larvaire des poissons zèbre du laboratoire ne présentait aucun retard par rapport aux données de la littérature (Meyer and Al. 1994).

En revanche, quelques anomalies du développement ont été décelées.

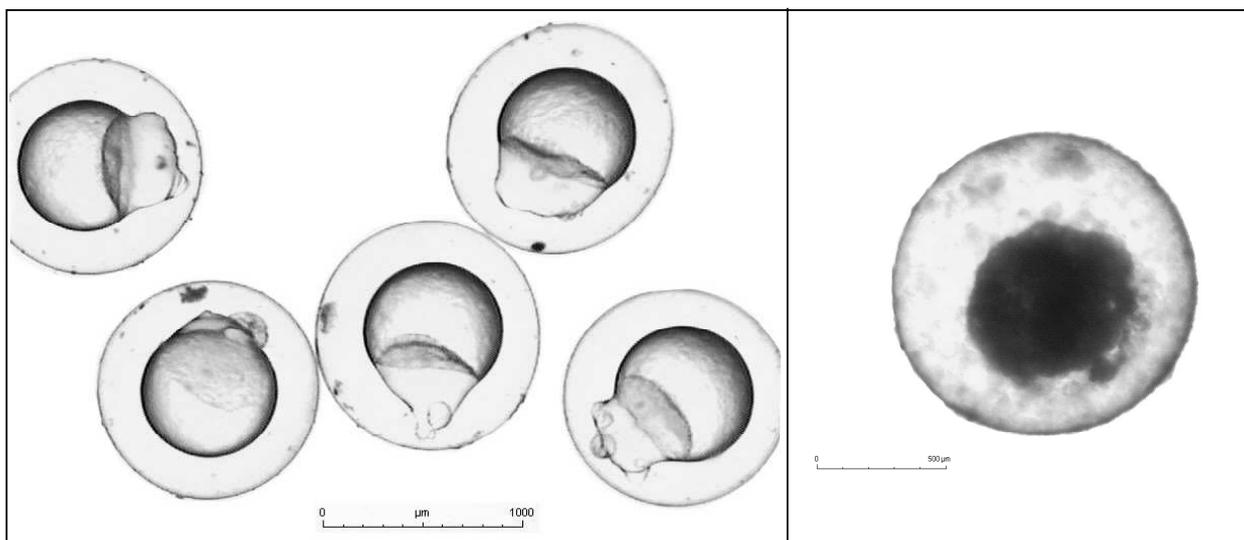
3.1.2 Principales anomalies observées

Deux grandes catégories d'anomalies ont été observées.

- Anomalies de la division cellulaire

Les principales anomalies de développement ont généralement été décelées à partir de la période de la blastula entre les stades 128 et 256 cellules (Figure 2).

Il semble qu'il y ait un dérèglement des divisions cellulaires. Le dôme de cytoplasme a une forme irrégulière. L'œuf meurt toujours avant d'atteindre le stade suivant. Il a alors un aspect coagulé.



*Figure 2 : A gauche : anomalie de développement entre les stades 126 et 256 cellules.
A droite : œuf coagulé.*

- Anomalies de l'éclosion

Moins fréquentes, elles ont été observées pendant la période de l'éclosion (Figure 3)

L'embryon est normal jusqu'au stade protruding mouth, mais l'éclosion n'a pas lieu. Pendant 24 heures, le cœur continue à battre, mais des malformations se développent. Par la suite, l'œuf coagule.

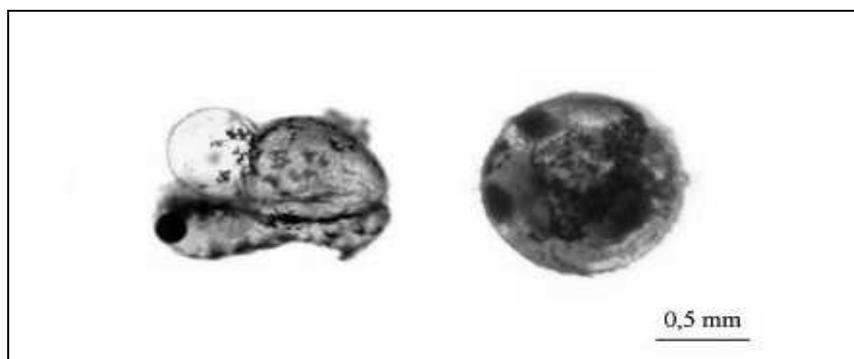


Figure 3 : Anomalies observées pendant le période de l'éclosion.

La mortalité des œufs provenant de l'élevage est due majoritairement à des anomalies de développement arrivant à partir du stade 128 cellules (t=2h15) et jusqu'à 4 heures après la ponte (fin de la période de la blastula) et peut atteindre jusqu'à 25% des œufs. C'est pourquoi, les œufs utilisés pour les tests sont récupérés entre 4 et 5 heures. On sélectionne ensuite les œufs ne présentant aucune anomalie.

Cela permet d'éliminer une grande partie de la mortalité naturelle.

3.2 TESTS DE TOXICITE SUR POISSONS ZEBRES ADULTES : CL50 (96H) *IN VIVO*

3.2.1 Vérification de la validité du lot

Le lot de 1200 poissons zèbres a été reçu le 17/07/03. On a relevé deux morts pendant le transport et aucun pendant la période de stabulation. La mortalité du lot a donc été inférieure à 5% pendant la période de stabilisation. Le lot a pu être utilisé pour l'essai.

Les résultats du test de toxicité du dichromate de potassium permettent d'évaluer la CL50 (24h) à 210,87mg/L avec un intervalle de confiance de : [208,85 ; 213,29] mg/L au risque d'erreur de 5% (Figure 4). La CL50(24h) du dichromate de potassium est conforme aux données historiques du laboratoire. Le lot est accepté pour l'essai.

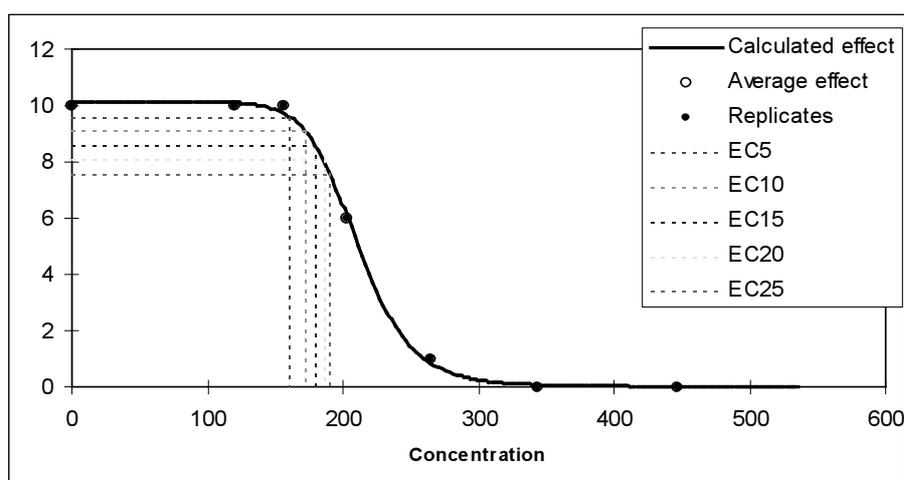


Figure 4 : Courbe représentant le nombre de poissons vivants en fonction de la concentration de dichromate de potassium.

De plus, 30 poissons pris au hasard ont été mesurés et pesés. La taille moyenne de cet échantillon est de $32,83 \pm 1,79$ mm. Le poids moyen de l'échantillon est de $0,36 \pm 0,05$ g, il est donc compris entre 0,25 et 0,45 g. Le calibrage du lot de poissons est conforme à la norme ISO NF EN 7346.

Le lot de poissons est donc accepté pour l'essai.

3.2.2 Résultats des tests de toxicité aiguë sur poissons zèbres adultes

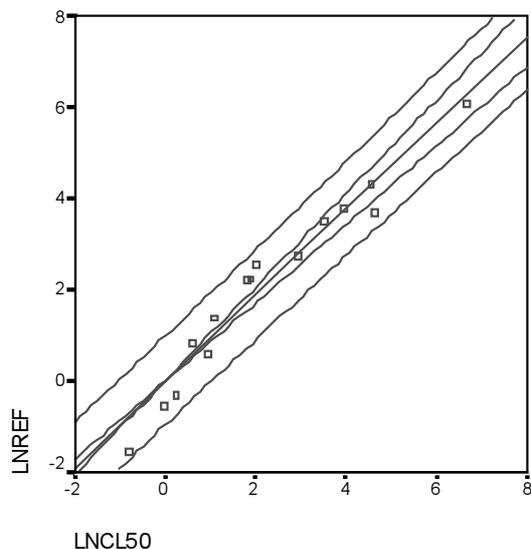
A l'heure actuelle, 25 substances ont été testées sur la trentaine de produits prévus. Les résultats des tests sont présentés dans le Tableau 1

Tableau 1 : Résultats des essais in vivo sur poisson zèbre.

CL50 en mg/ml de Matière active			
	Nom	CL50 ref	CL50 Ineris
POLYM	Gafquat 755	>200	> 200
POLYM	Gafquat 755 N	4,47	> 100
POLYM	Gafquat HS 100	23,81	3,25
POLYM	Jaguar C 14 S	0,44	> 16
POLYM	Luviquat FC 550	0,58	0,99
POLYM	Luviquat HM 552	0,56	0,55
POLYM	Merquat 280	0,74	1,27
POLYM	Merquat 3330	> 100	> 90
POLYM	Merquat 550	3,93	2,97
POLYM	52762 (Merquat 100)	0,21	0,46
TA	117 T	9,31	6,82
TA	2092	435	798,77
TA	2137	2,37	1,88
TA	2730	8,99	6,34
TA	52258	33	33,81
TA	52350	44	52,13
TA	71140	15,61	18,80
TA	71577	1,77	2,62
TA	71673	12,8	7,52
TA	836	>200	10<CL50<100
	1,1,2-Trichloroéthane	40	101,30
	1-chloro-2-	1,2	> 4
	2-Hydroxypropanoic acid, Butyl ester	75	96,16
	3-Methylbutanal	3,25	>12
	Trichloroéthylène	16	> 64

Il existe une bonne corrélation entre les données obtenues à l'INERIS et celles de la littérature (Figure 5). La régression passe par l'origine et sa pente n'est pas significativement différente de 1.

Les CL50 de 4 substances n'ont pas pu être déterminées. En effet, on n'observe aucune toxicité pour le 1-chloro-2-nitrobenzène, le 3-méthylbutanal et le trichloroéthylène aux concentrations testées. Pour ces substances, il peut s'agir d'un artefact liée à leur volatilité et aux conditions de réalisation des essais. De même, nous n'avons pas encore pu déterminer la CL50 du Gafquat 755 N. En ce qui concerne ce produit, il s'agit d'un mélange d'isomères, et la toxicité du lot testé peut être différente de celle obtenue dans la littérature sur un autre lot de produit.



$$\text{LN (CL50) ref} = 0.971 \text{ LN(CL50) Ineris} \quad R^2 = 0.953 \quad p < 0.001$$

Figure 5 : Graphique représentant les CL 50 (96h) obtenues à l' INERIS en fonction des CL 50 (96h) obtenues dans la littérature.

3.3 TESTS DE TOXICITE AIGUË SUR ŒUFS DE POISSONS ZEBRES : CL50 IN VITRO

Dans un premier temps, on a réalisé un test avec du dichromate de potassium (substance de référence pour les tests sur adultes). On constate que le dichromate de potassium ne donne pas le même résultat pour les tests de toxicité sur les stades embryo-larvaires que pour les tests sur adultes puisqu'il ne semble pas toxique sur les œufs..

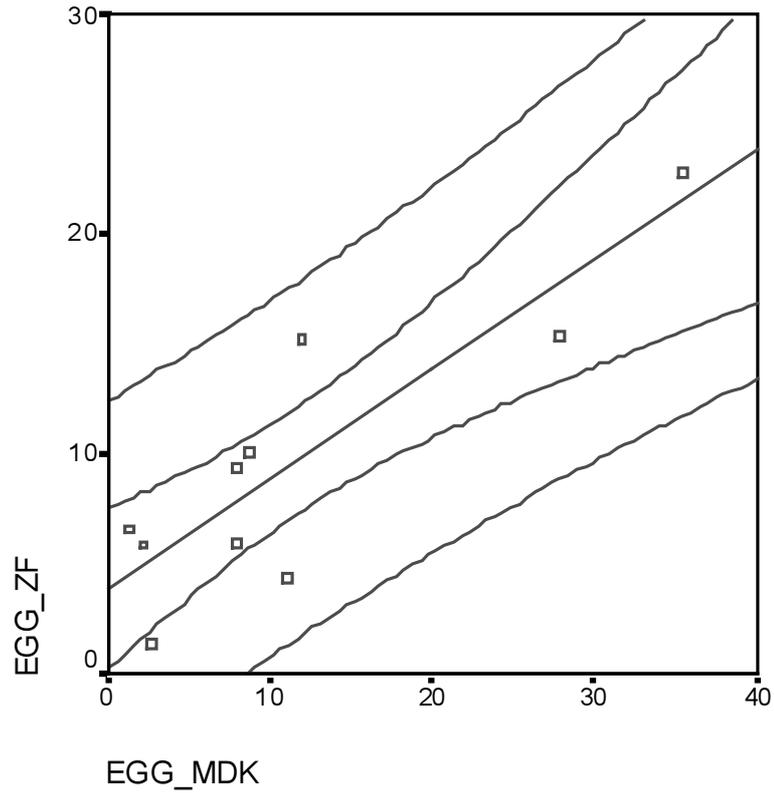
Une étude approfondie de la constitution de la paroi des œufs permettrait de comprendre ces résultats. En effet, il est possible que la paroi des œufs ne soit pas perméable au dichromate de potassium.

Dans un deuxième temps, les substances pour lesquelles on avait pu déterminer la CL50 sur adulte ont été testées sur œufs. Les résultats des tests sur œufs réalisés sur poisson zèbre ont été comparés à ceux obtenus parallèlement sur Medaka (Tableau 2 et Figure 6).

D'un point de vue global, les deux tests sont assez bien corrélés. Les poisson zèbre paraissant plus sensible en particulier pour les polymère cationiques qui ne répondent pas sur œufs de Medaka.

Tableau 2 : Résultats des tests de toxicité aiguë sur œufs de poisson zèbre et de medaka.

	Code	MEDAKA	DANIO
		Moyenne CL 50 (mg/L)	Moyenne CL 50 (mg/L)
		œufs J5	œufs 48H
P O L Y M E R E S C A T I O N I O	Merquat 280	> 100	~100
	Merquat 550	> 100	117,8
	Merquat + 3330	> 100	> 100
	52 762 Merquat 100	> 100	~100
	Luviquat FC 550	> 100	5,54
	LuviquatHM 552	> 100	100
	Jaguar C 14 S	> 100	> 100
	Gafquat 755	> 100	> 100
	Gafquat 755 N	> 100	> 100
	Gafquat HS 100	> 100	> 100
T E N S I O A C T I F	836	> 100	107,5
	1 185	9,69	10 < CI50 < 25
	1 187	1,31	6,52
	1 410	11,91	15,22
	2 092	> 1000	440,93
	2 137	2,69	1,43
	2 730	7,84	9,32
	52 258	27,82	15,42
	52 350	35,39	22,87
	52 693	2,21	5,82
	71 140	10,70	< 5
	71 577	7,87	5,98
	71 673	11,14	4,38
	117 T	8,62	10,07
1686 M	> 100	> 100	



$$\text{EGG_zf} = 0.613 \text{ EGG_MDK} + 4.050 \quad R^2 = 0.943 \quad p < 0.001$$

Figure 6 : Comparaison des CL50 obtenues sur œufs de poisson zèbre et de Medaka.

La comparaison entre les résultats obtenus pour l'ensemble des substances sur œufs de poisson zèbre et sur adultes montre une absence de corrélation (Figure 7). Si on exclu les polymères cationiques de cette comparaison on observe une corrélation significative entre les tests sur œufs et les tests in vivo (Figure 8).

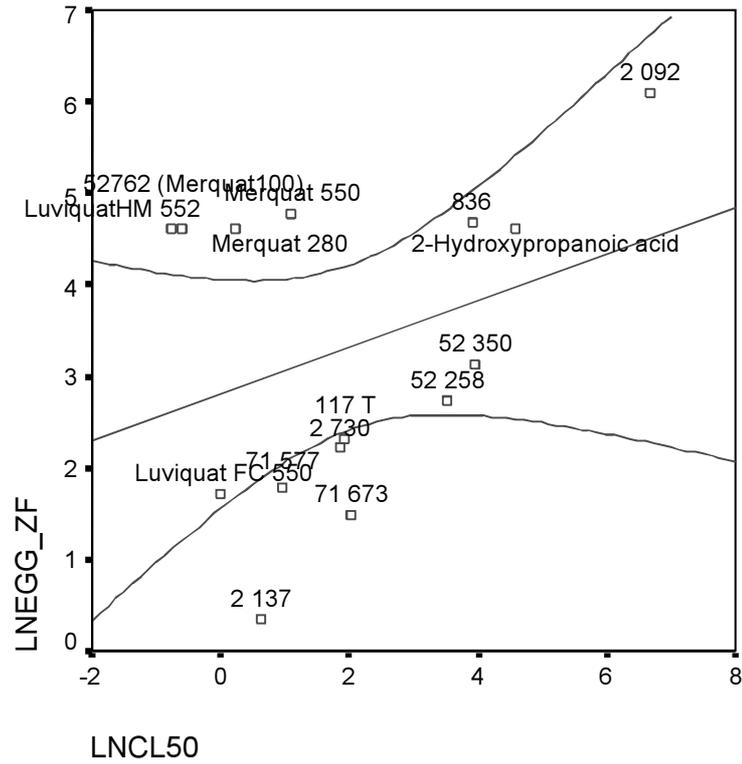
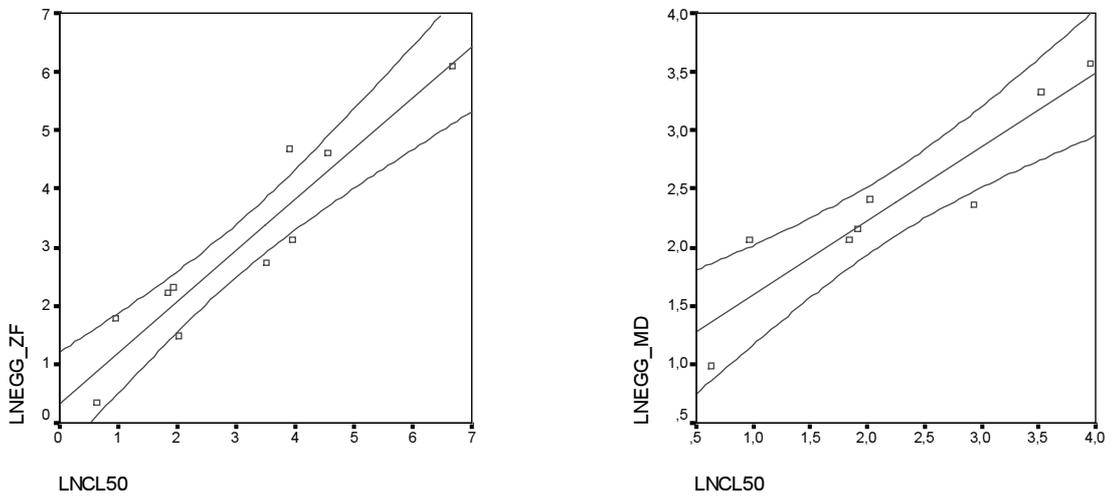


Figure 7 : Comparaison des CL50 obtenues sur œufs de poisson zèbre en fonction des CL 50 obtenues sur adultes (absence de corrélation).



$$\text{Ln}(\text{CL}50) = 0.952 \text{Ln}(\text{EGG_zf})$$

$$R^2 = 0.978 ; p < 0.001$$

$$\text{Ln}(\text{CL}50) = 0.633 \text{Ln}(\text{EGG_MD}) + 0.959$$

$$R^2 = 0.832 ; p < 0.001$$

Figure 8 : Corrélation entre les tests sur œufs et sur adultes après suppression des polymères cationiques.

4. CONCLUSION

Les tests de toxicité aiguë sur poissons zèbres adultes sont conformes à ceux de la littérature quelque soit le type de substances testées. Ces essais donnent donc des résultats fiables sur lesquels on peut se baser pour réaliser des comparaisons avec les essais sur les stades embryo-larvaires de ce modèle.

Le suivi du développement embryo-larvaire du poisson zèbre a permis de déceler un stade critique où apparaissent des anomalies fréquentes. Grâce à cette observation, nous avons décidé de sélectionner les œufs ne présentant aucune anomalie 4 heures après la fécondation afin d'éliminer la mortalité naturelle durant les tests de toxicité.

Les résultats des tests sur les stades embryo-larvaires correspondent relativement bien à ceux obtenus sur stade adulte pour les tensioactifs et les produits de référence. Cependant, les polymères cationiques apparaissent comme non toxiques sur les œufs pour une gamme de concentration allant jusqu'à 1g/L, alors que les CL50(96h) de ces polymères sur les adultes sont très faibles.

Des résultats préliminaires sur alvins vésiculés laissent penser que ce stade pourrait être mieux adapté pour prédire les résultats des tests sur poissons adultes (CL50 96h).

Ces résultats préliminaires ayant été obtenus sur un nombre limité de substances, d'autres molécules vont être introduites dans l'étude afin de conforter les corrélations obtenues. Parallèlement, des tests sur alvins seront réalisés en particulier sur les polymères cationiques afin de préciser la sensibilité du modèle biologique en fonction du stade de développement.

5. BIBLIOGRAPHIE

Laale, H. W. (1997). "The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research". A literature review. J. Fish Biol **10** : pp. 121-173.

Ligne Directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n°203. (1992).

Ligne Directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n°210. (1992).

Meyer (1993). "Zebrafish book" Proc. Roy. Soc. Lond **252** : 231-236.

Nagel R. (2002). "DarT : The Embryo Test with the Zebrafish *Danio rerio* – a General Model in Ecotoxicology and Toxicology". Altex **19** : 38-48.

Norme Européenne NF EN ISO 7346-1 (1998).

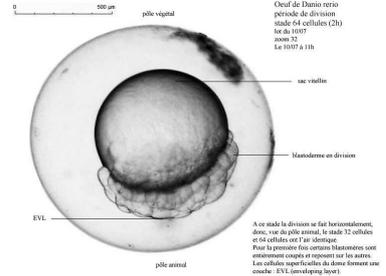
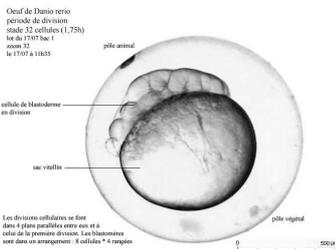
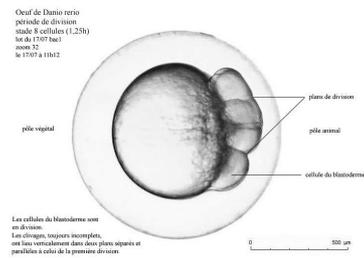
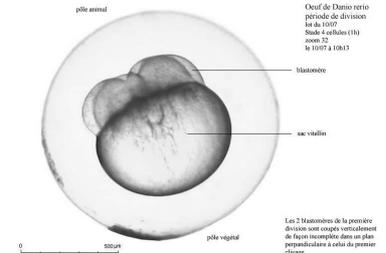
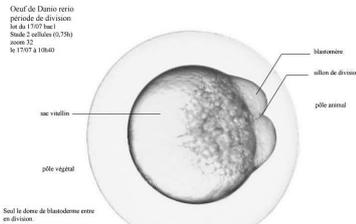
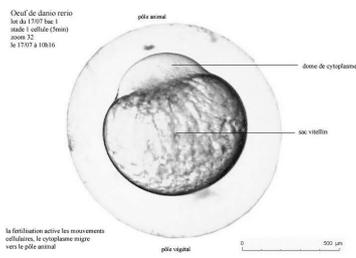
Roex E. W. M. and al. (2002). "Sensitivity of the zebrafish (*Danio rerio*) early life stage test for compounds with different modes of action". Environmental Pollution **120** : 355-362.

6. LISTE DES ANNEXES

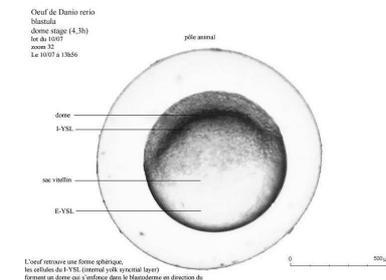
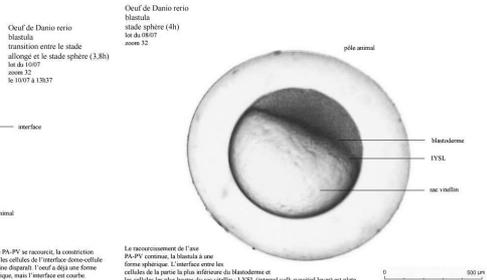
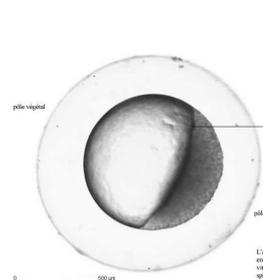
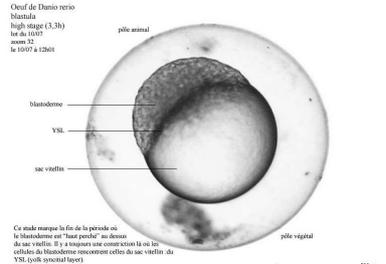
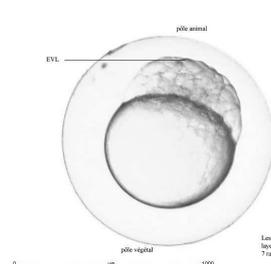
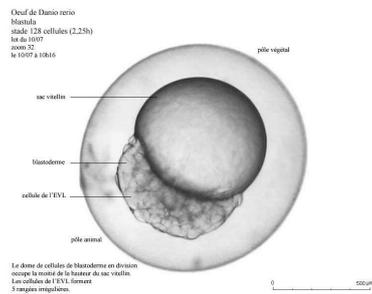
Repère	Désignation précise	Nb/N°pages
1	Clichés des œufs de poisson zèbre	2

ANNEXE 1 CLICHES DES ŒUFS DE POISSON ZEBRE.

Période de division



Période de la Blastula



LISTE DE DIFFUSION

Nom	Adresse/Service	Nb
	Dossier maître	1
M. COQUERY		1
P. HUBERT		1
G. LABROYE		1
V. LAFLECHE		1
H. MAGAUD		1
JM. PORCHER		1
F. MARCEL		1
A. MORIN		1
E. THYBAUD		1
P. BERTEAUD		1
G. GOLASZEWSKI		1
C. JOURDAN		1

TOTAL 13

Fin du Complément non destiné au client