



Non Destructive In Vivo Measurement of EROD activity by Zebrafish Prolarva

P. Noury

► To cite this version:

P. Noury. Non Destructive In Vivo Measurement of EROD activity by Zebrafish Prolarva. 2016, pp.15. hal-02602442

HAL Id: hal-02602442

<https://hal.inrae.fr/hal-02602442>

Submitted on 16 May 2020

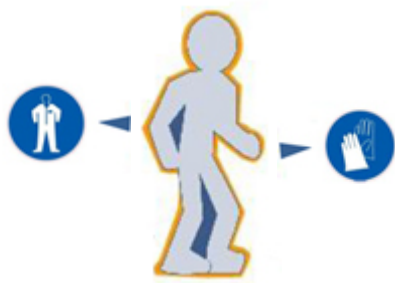
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MODE OPERATOIRE/PROTOCOLE

Mesure EROD par efflux sur stade pro-larvaire de poisson zèbre (Danio Rerio)

AVERTISSEMENT ET PRECAUTIONS DE SECURITE



Le présent mode opératoire nécessite l'utilisation de **substances toxiques** il convient donc de respecter les règles de sécurité indispensables à l'utilisation de tels produits.

Le schéma ci-contre rappelle les Equipements de Protection Individuels indispensables

Les produits et manipulations à risques ainsi que les moyens de protections spécifiques sont détaillés dans le contenu de ce document.

N° de version	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
1	Nom : NOURY Fonction : IE Date/visa : 02/02/2016	Nom : TUNTUNDJIAN Fonction : IR Date/visa : 02/02/2016	Nom : GEFFARD Fonction : Responsable du laboratoire d'Ecotoxicologie Date/visa : 02/02/2016

Mises à jour			
N° de version	Date	Auteur	Modifications apportées par rapport à la précédente version

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION.....	2
1.1	Objet.....	2
1.2	Domaine d'application.....	2
1.3	Références.....	2
1.4	Définitions et abréviations.....	3
2	VOLET SECURITE	3
3	PROTOCOLE	3
3.1	Principe	3
3.2	Matériel et réactifs.....	4
3.2.1	Modèle biologique.....	4
3.2.2	Produits utilisés	5
3.2.3	Solutions préparées.....	5
3.2.4	Matériel.....	6
3.3	Mode opératoire	7
3.3.1	Pontes.....	7
3.3.2	Préparation des groupes expérimentaux	7
3.3.3	Exposition préalable aux toxiques	8
3.3.4	Suivi physico-chimique	8
3.3.5	Extraction des œufs blancs 24h.....	8
3.3.6	Préparation de la microplaque	9
3.3.7	Lecture au fluorimètre	9
3.3.8	Gamme étalon de résorufine.....	10
3.3.9	Euthanasie des prolarves.....	10
3.3.10	Vaisselle	11
3.4	Résultats.....	11
3.4.1	Calcul de l'activité EROD	11
3.4.2	Evaluation et interprétation des résultats	12
3.4.3	Rapport d'essai	13
4	SYNTHESE DU DOCUMENT	14

1 INTRODUCTION

1.1 Objet

Cette méthode décrit la mesure in vivo, par détection fluorimétrique dans un milieu d'essai d'un efflux issu d'une activité de bio transformation de pro-larves de poissons zèbre exposées à de l'éthoxyrésorufine.

Cette activité de biotransformation, est une activité EROD (Ethoxy-Resorufine-O-Dééthylase) mesurée en réponse à une exposition préalable des organismes à un échantillon ou une substance susceptible de moduler cette activité.

Le présent protocole comprend donc la phase d'exposition préalable selon un protocole standard suivi de la phase de mesure de l'activité EROD par efflux.

1.2 Domaine d'application

La méthode est particulièrement adaptée à la détection de substances inductrices de l'EROD potentiellement présentes dans des extraits organiques issus d'échantillons environnementaux et notamment de sédiments.

La méthode est directement applicable à l'étude des substances organiques hydrophobes, notamment les molécules de type aromatiques telles que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HaP), les Polychlorobiphényles (PCB), les dioxines, etc.

La méthode peut être appliquée à des substances pures solubles dans l'eau mais qui ne sont généralement pas ou peu inductrices de l'EROD.

La méthode peut être appliquée à des eaux naturelles telles que les eaux de rivières ou effluents de stations d'épuration. Cependant la présence de matière organique biodégradable dans l'échantillon entraîne des précautions en termes de protocole d'exposition des organismes et d'interprétation des résultats d'induction : d'une part la matière organique peut être la source de composés toxiques azotés tels qu'ammoniac et nitrites ; d'autre part, elle limite par adsorption la biodisponibilité des substances inductrices éventuellement présentes et influe ainsi négativement sur l'activité EROD obtenue.

La méthode permet également de détecter des inhibitions sur une activité EROD basale ou co-induite par une substance de référence (Benzo a pyrène ou Beta naphthoflavone).

A noter que le présent protocole décrit une exposition préalable statique de 4 jours adaptée à l'étude de substance relativement stable et peu volatile.

1.3 Références

Noury P, Geffard O, Tutundjian R, Garric J. 2006. Non destructive in vivo measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva: Development and application. *Environmental Toxicology* 21(4):324-331.

Noury P. Elevage du danio rerio, répertoire des instructions d'élevage, laboratoire d'Ecoxicologie, Cemagref de Lyon.

Chalopin, D. - 2007. Evaluation d'un essai EROD in vivo sur stade prolarvaire de *Danio rerio* pour l'étude du potentiel inducteur d'extraits organiques de sédiments. IUT A, Génie biologique, option agronomie, Lyon I. 58 p.

1.4 Définitions et abréviations

- **Fraction S9** : surnageant obtenu après centrifugation 15 minutes à 9000g des homogénats.
- **EROD** : Ethoxy-Resorufine-O-Dééthylase.
- **PCB** : Polychlorobiphényle
- **HAP** : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
- **BnF** : Beta Naphtoflavone
- **FCR** : Force Centrifuge Relative
- **MS 222** : Méthasulfonate de sodium

2 VOLET SECURITE

MS 222	BaP			Résorufine	Acétone	
						
Méthanol			BnF			
						

Figure 1 : Symboles de danger de la procédure

3 PROTOCOLE

3.1 Principe

La méthode présentée est une mesure indirecte, in vivo et non destructive de l'activité cytochrome P450 1A chez la prolarve de *danio rerio* en réponse à une exposition préalable à des substances pures, des extraits organiques ou des eaux naturelles depuis un stade embryonnaire précoce jusqu'à un stade prolarvaire.

A l'issue de l'exposition préalable, les organismes sont mis en présence d'un substrat, la 7-éthoxyrésorufine. Ce substrat est alors assimilé puis transformé en résorufine qui après excrétion dans le milieu test est quantifiée en continu par fluorimétrie. L'activité de biotransformation est déterminée en calculant la vitesse de formation de la résorufine dans le milieu.

L'exposition préalable a lieu en bouteille de verre, à 26°C durant 96 heures (4 jours) depuis le stade 2 heures post fertilisation. Après incubation, les prolarves sont tamisées, transférées et réparties dans une microplaque contenant de l'eau d'essai. Après ajout d'éthoxyrésorufine (concentration finale = 1,5 μM) une cinétique de fluorescence est déterminée à raison d'une mesure par heure pendant 5 à 6 heures. L'excitation a lieu à 545 nm et l'émission est mesurée à 587 nm (résorufine) et 565 nm (ligne de base).

La méthode décrite prévoit l'utilisation de plaque 24 puits, à raison de 6 puits par groupe expérimental et 10 larves par puit (mesures pondérées). A noter cependant la possibilité d'utiliser des plaques 96 puits à raison de par exemple 12 puits par groupe expérimental (1 rangée) et 1 larve par puit (mesures individuelles). Cette variante bien que moins aisée de mise en œuvre et un peu moins sensible peut être utile dans certains cas de suivi individuel des larves.

Une gamme étalon de résorufine est utilisée pour convertir les valeurs de fluorescence et exprimer l'activité en femtomole de résorufine par heure et par larve (fmol/h/larve). L'activité peut aussi être exprimée en pourcentage (ou rapport d'induction) vis à vis d'un groupe témoin négatif (prolarves n'ayant pas subies d'exposition toxique préalable). Un à deux groupes témoins positifs sont également préconisés pour mesurer la réactivité de l'induction vis à vis d'une substance de référence (BaP, BNF). Un témoin solvant, voire des blancs d'extraction pour les extraits peuvent aussi être nécessaires pour valider l'essai.

3.2 Matériel et réactifs

3.2.1 Modèle biologique

Le *Danio rerio* est un poisson tropical de la famille des cyprinidés. Il est originaire du Gange et du Brahmapoutre dans le Golfe du Bengale et au nord de la Birmanie. Il est de maintenance aisée en laboratoire, sa petite taille (4 à 5 cm de long maximum) facilite son stockage en aquarium.

A l'âge adulte, ce poisson présente un dimorphisme sexuel facilitant le tri des sexes pour la reproduction.

Nos géniteurs proviennent d'un éleveur spécialisé (*Elevage de la Grande Rivière* à Saint Forgeux (69)) et sont munis d'un certificat d'origine. Ils sont utilisés âgés de 6 et 20 mois pour obtenir les œufs nécessaires à chaque essai. La veille de l'essai on isole durant une nuit à 26 °C $\pm$ 1 °C en petits aquariums munis de pondeurs plusieurs groupes de 2 femelles et 3 mâles, tous issus d'un même lot commercial. Au matin les œufs sont pondus en réaction au déclenchement automatique de l'éclairage (8h30) puis, peu après les œufs sont récoltés, poolés et mis en exposition préalable au stade blastula, 2 à 3 heures post-fertilisation (hpf). Les éclosions s'étalent entre 48 à 96h (à 26°C), l'organisme obtenu au bout de 4 jours étant qualifié de prolarve présente une faible mobilité et une dépendance alimentaire envers sa réserve vitelline.

3.2.2 Produits utilisés

Tableau I : Produits chimiques de la procédure

PRODUIT	N° CAS	REF.	RANGEMENT
7-Ethoxyresorufine	5725-91-7	Sigma # E3763	Armoire 2 (solution) ou congel. -20 °C (produit pur)
Résorufine	34994-50-8	Sigma # R3257	Congél. -20 °C (poudre et solution)
Méthasulfonate de Sodium (MS 222)	886-86-2	Sigma # A5040	Congél. -20 °C
Diméthyl sulfoxyde (DMSO)	67-68-5	Sigma # D5879	Armoire Solvant
Benzo-a-Pyrène	50-32-8	Sigma # B1760	Réfrigérateur 4°C
Beta-Naphtoflavone,	6051-87-2	Sigma # N3633	Réfrigérateur 4°C
Acétone de qualité analytique	67-64-1		Armoire Solvant
Méthanol de qualité analytique	67-56-1		Armoire Solvant

3.2.3 Solutions préparées

Eau d'essai

L'eau de dilution utilisée tant pour l'exposition préalable en bouteille de verre que pour l'exposition en microplaque à l'éthoxyrésorufine est la même que celle utilisée pour l'élevage. Le milieu d'élevage des poissons (FOS₂₉₀) est un mélange d'eau de forage brute et d'eau osmosée réalisé en continu de façon à obtenir une eau d'une conductivité de $290 \pm 30 \mu\text{S}$, d'un pH de 7.2 ± 0.2 et d'une dureté de $120 \pm 10 \text{ mg CaCO}_3$.

Substrat : 7 éthoxyrésorufine

La solution mère d'éthoxyrésorufine ($241,2 \text{ g.mol}^{-1}$) est préparée en dissolvant une dose commerciale dans du DMSO de façon à obtenir une solution de concentration 1,5 mmolaire (concentration proche de la saturation). Cette solution se conserve 1 an à température ambiante; La dilution finale dans le milieu aqueux du milieu d'essai est de $1^0_{/00}$ (v/v).

Inducteur de référence : Benzo a Pyrène (BaP)

Le benzo-a-pyrène est utilisé préférentiellement comme substance inductrice de référence : il est d'une part identifié comme substance « repère » dans la classification toxique des HaPs et d'autre part entraîne une induction EROD log-linéaire avec la concentration. La beta naphtoflavone moins toxique peut être aussi utilisée mais ne présente pas de réponse log-linéaire en fonction de la concentration (voir annexe 1).

Le BaP utilisé provient de chez Sigma-Aldrich. Une solution mère à 300 mg.L^{-1} est préparée dans l'acétone ou le méthanol. Cette solution est conservée à 4°C.

Les organismes sont exposés aux concentrations de 3 et $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ en respectant une proportion de solvant dans l'eau d'essai de $1^0_{/000}$ (v/v). Ces concentrations en BaP se situent respectivement légèrement en deçà et au-delà de la limite de sensibilité de la méthode ($1 \mu\text{g.L}^{-1}$) et de l'induction maximale ($120 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Etalon de résorufine

Une solution mère de *résorufin sodium salt* ($235,2 \text{ g.mol}^{-1}$) est préparée à la concentration de $460 \mu\text{M}$ dans du DMSO ($10,8\text{mg}/100\text{ml}$) en prenant soin de bien agiter (2 heures minimum). Cette solution est ensuite aliquotée en tube de verre bouchée, congelée puis conservée à 20°C durant 1 an maximum. Au moment de l'emploi un aliquote est décongelé rapidement au bain marie et une solution fille à $100 \mu\text{M}$ préparée dans du DMSO. Ensuite une gamme étalon est réalisée dans ce solvant puis transférée en milieu aqueux à la proportion de 1‰.

Anesthésiant : méthasulfonate de Sodium (MS 222)

Le MS 222 est utilisé pour euthanasier les larves en fin d'essai. Une solution mère est préparée au moment de l'emploi puis distribuée dans les récipients d'essai (bouteilles et microplaques) pour l'obtention d'une concentration finale de 100 mg/l permettant le décès des organismes en moins de 30 min.

3.2.4 Matériel

Récipients pour l'élevage

Des récipients dédiés sont utilisés pour la relève et le tri des pontes. Ils ne doivent être utilisés qu'à cette unique tâche et ne doivent en aucun cas quitter la salle élevage ni être en contact avec un quelconque toxique. Pour la préparation d'un essai on utilisera les cristallisoirs de 250 ml pour recueillir les œufs de chaque pondeur, un grand cristallisoir de 500ml pour pooler les œufs, des godets en plastique de 50ml pour la préparation des groupes expérimentaux ainsi que l'éprouvette de 250 ml au moment du transfert des groupes expérimentaux en bouteille d'essai.

Récipients pour l'essai

L'exposition préalable est réalisée dans une vaisselle spécifique et réservée. Les organismes sont exposés aux toxiques en bouteilles de verre d'un litre muni de bouchon. La manipulation des organismes au moment de l'extraction des œufs blancs 24h s'effectue après transfert du milieu d'essai en cristallisoir de 250 ml réservés à cet usage et identifié par un code couleur (vert = témoins, rouge = BaP ; autres couleurs = échantillons). Ensuite les milieux d'essais sont à nouveau transvasés dans les bouteilles au moyen d'entonnoir pareillement codés.

L'exposition des prolarves à l'éthoxyrésorufine est réalisée en microplaque transparente de polystyrène à fond plat. Le modèle actuellement utilisé est la plaque 24 puits Nunc. Ces plaques sont à usage unique.

Petit matériel

- Une pipette P1000 « propre » (salle élevage) est utilisée pour le comptage et la préparation des groupes expérimentaux en godets de 50 ml.
- Une pipette P1000 « dédiée toxiques » (salle truite) est utilisée pour l'extraction des œufs blancs 24h et le transfert des larves en microplaque à 96h.
- Des pipettes à déplacement positif (salle préparation) sont utilisées pour la manipulation des solvants, de la solution mère de BaP, et la solution mère d'éthoxyrésorufine.
- Un morceau de tamis nylon à usage unique ($1 \times 2 \text{ cm}$) tenu au bout d'une pince autoserrante est utilisé pour le tamisage et transfert des larves en microplaque.

- Une multipette Eppendorf est utilisée pour la distribution en microplaque du milieu d'essai, de la solution aqueuse d'ethoxyrésorufine, puis du MS222.
- Conductimètre, pH mètre, oxymètre, thermomètre, ainsi que des kits pour le dosage rapide de l'ammonium et des nitrites seront utilisés, particulièrement lors d'études sur eaux naturelles.

Spectrofluorimètre

Pour les mesures de fluorescence, un spectrofluorimètre à monochromateur permet de régler les longueurs d'onde aux valeurs optimisées pour la méthode : Excitation 545 nm ; Emission 587 et 565 nm. Si un appareil à filtres doit être utilisé se placer aux longueurs d'ondes les plus proches.

Environnement thermostaté

L'exposition préalable en bouteille ainsi que le stockage des microplaques entre deux mesures de fluorescence à lieu en enceinte thermostatée à 26°C. Un bain marie peut aussi être utilisé pour les bouteilles.

La préparation des groupes expérimentaux d'embryons, l'extraction des œufs blancs et la répartition des prolarves en microplaque a lieu à température ambiante en veillant à minimiser la durée de manipulation à cette température.

3.3 Mode opératoire

3.3.1 Pontes

La veille de l'exposition préalable, des petits groupes de 1 femelle pour 2 mâles ou 2 femelles pour 3 à 4 mâles sont constitués dans des aquariums de ponte dans lequel ont été immergés des pondoires à fond grillagé avec une hauteur d'eau disponible pour les poissons d'environ 4 cm. Une augmentation de 1°C de la température par rapport un bac de stockage peut être stimulant pour les géniteurs. On peut espérer obtenir 400 à 600 œufs en moyenne par femelle au lieu de 100 à 200 dans de bonnes conditions pour une ponte dans l'aquarium de d'ensemble (ponte dite « générales »).

La ponte a lieu après déclenchement automatique de l'éclairage entre 8h30 et 9h. Eviter de se rendre en la salle élevage durant ce laps de temps pour ne pas perturber les géniteurs.

Les géniteurs sont ensuite replacés dans le bac de stockage, les œufs de chaque pondeur transvasé en cristalliseur (250ml) spécifiques numéroté avant d'être poolé en grand cristalliseur de 500ml. Pour le pool, éliminer les pontes peu abondantes (souvent de piètre qualité) ou présentant un fort taux d'œufs non fécondés (blanc).

3.3.2 Préparation des groupes expérimentaux

Au terme de l'exposition préalable 60 prolarves sont nécessaires à la constitution d'un groupe expérimental en vue de la mesure EROD (10 prolarves/puit sur une rangée de 6 puits de microplaque). Le nombre d'embryons en début d'exposition préalable doit donc être suffisant compte tenu du taux supposé d'œufs blancs à 24h et de la mortalité éventuelle en cours d'exposition (toxicité éventuelle de l'échantillon).

Dans ce but chaque groupe expérimental est représenté au départ par 120 œufs réparti en 2 sous-groupes de 60 œufs/300ml placé en bouteilles de 1 litre :

- Pour cela préparer 2 godets plastique de 50 ml rempli à ras bord et contenant chacun 60 œufs
- Verser le contenu des godets dans chaque bouteille et ajouter, en rinçant le godet, 250 ml d'eau d'essai au moyen d'une éprouvette.

3.3.3 Exposition préalable aux toxiques

Pour étudier une eau naturelle, 250 ml de milieu à tester (brut ou pré-diluée) est introduit au 50 ml d'eau d'élevage contenant les œufs. La concentration maximum de l'échantillon est alors de 80 %.

Pour l'étude d'une substance organique ou d'un extrait organique, la proportion de solvant introduit dans le milieu d'essai doit être inférieure de 1‰, soit 30 µl d'extraits ou de solution organique dans 300ml d'eau essai. Après introduction de ce volume à l'aide d'une pipette à déplacement positif agiter manuellement la bouteille (pas de barreau aimanté pour ne pas blesser les embryons déjà dans la bouteille). Placé ensuite les bouteilles à 26°C, bouchon posé mais non vissé pour faciliter le passage de l'air

Durant les 96 h d'exposition statique un bullage peut être nécessaire pour palier à la demande biochimique en oxygène d'un l'échantillon d'eau naturelle ainsi que pour limiter par stripage la toxicité de l'ammoniac formé. Les bouteilles sont maintenues en enceinte thermostatée à 26°C à l'abri d'un éclairage direct.

3.3.4 Suivi physico-chimique

Un suivi physico-chimique est nécessaire en cas d'exposition des larves à des eaux naturelles, notamment des effluents. Dans ce cas, des mesures de pH, conductivité et oxygène ainsi que des dosages de nitrites et d'ammonium seront réalisés à 24h lors de l'extraction des œufs blancs et à 96h en fin d'exposition préalable. Les mortalités constatées à 96h sont souvent due au fort taux d'ammoniac provenant de la matière azotée de l'échantillon puis à l'ammoniac engendré par la décomposition des premiers cadavres de larves. Un stripage (bullage) des échantillons durant 24h avant l'introduction des embryons puis pendant l'exposition réduit la toxicité du milieu mais les teneurs en ammoniac (NH_3) peuvent rester élevées voire mortelles dans les effluents.

A noter que des extraits organiques de sédiment peuvent aussi entraîner des mortalités de larves. Les nitrites et l'ammonium dosés à 96 h n'est alors issue que de la dégradation des larves mortes et des chorions.

3.3.5 Extraction des œufs blancs 24h

Après 24 h d'exposition, chaque bouteille est transvasée en cristalliseur et les embryons non développés (œufs blancs) sont extraits à l'aide d'une pipette (P1000) muni d'un embout tronqué puis comptabilisés. Le contenu du cristalliseur est ensuite ré-introduit dans la bouteille qui est replacée en enceinte thermostatée. Veiller lors des transvasements successifs à bien recueillir tous les embryons.

A noter qu'un taux d'œufs blancs « acceptable » ne devrait pas dépasser 30%.

3.3.6 Préparation de la microplaque

Après 96 h d'exposition le contenu de chaque bouteille est à nouveau transvasé en cristallisoir et les prolarves réparties en microplaque.

Dans ce but et pour chaque groupe expérimental :

- Disposer 1,5 ml d'eau d'essai (FOS 290) dans une rangée de 6 puits de micro-plaque 24 puits.
- Verser le contenu d'une bouteille en cristallisoir
- Prélever plusieurs larves à la pipette et les tamiser sur un petit rectangle (1x2cm) de tamis nylon (200 μ m) tenu au bout d'une pince (de préférence autoserrante).
- Sécher le tamis sur le rebord du cristallisoir puis sur un papier absorbant pour enfin déposer les larves dans un puit de microplaque
- Compter 10 larves par puits et 3 puits par bouteille, soit une rangée de 6 puits pour un groupe expérimental de 2 fois 30 larves.
- Du cristallisoir, extraire et compter les larves éventuellement mortes ou non écloses. Afin de ne pas perdre de temps il est préférable de compter les larves vivantes restantes en fin de manipulation après euthanasie des organismes
- Remplacer donc le contenu du cristallisoir dans la bouteille en attendant ce moment.
- Répéter ces opérations pour chaque groupe expérimental et lorsque la microplaque est remplie préparer une solution aqueuse d'éthoxyresorufine (ER) à la concentration de 6 μ M soit 4 μ l de la solution mère d'ER par ml de FOS 290 (60 μ l / 15 ml pour une plaque). Agiter fortement à l'aide d'un barreau magnétique.
- Allumer et régler le fluorimètre
- Répartir 0,5 ml de la solution aqueuse d'ER dans chacun des puits (1,5 μ M final), agiter légèrement, lancer la première lecture de la plaque puis placer celle-ci en enceinte thermostatée en attendant la suivante.

3.3.7 Lecture au fluorimètre

- Allumer le fluorimètre (Tecan Safire) et l'ordinateur associé.
- Ouvrir le programme Xfluor4 (démarrer/programme/Tecan/Xfluor4) puis activer la macro
- Connecter l'ordinateur au Safire (Xfluor/connect/Safire)
- Ouvrir la boîte à onglets Xfluor/measurement parameter
- Dans le premier onglet cocher Fluorescence intensity et décocher Move plate after measurement
- Dans les onglets suivants régler les paramètres comme suit :

Measurement mode:	Fluorescence Top
Excitation wavelength:	545 nm
Emission wavelength:	587 nm
Excitation bandwidth:	5.0 nm
Emission bandwidth:	5.0 nm
Gain (Manual):	135
Number of flashes:	3
Lag time:	0 μ s
Integration time:	40 μ s
Plate definition file:	NUN24ft-nouvelle.pdf
Z-Position (Manual):	8200 μ m

- Lancer une première mesure (Xfluor/start measurement) de la plaque (sans couvercle)
- Juste après lancer une deuxième mesure en changeant préalablement la valeur d'émission : régler 565 nm à la place de 587 nm
- Sortir la plaque, la recouvrir de son couvercle et la placer en enceinte thermostatée jusqu'aux mesures suivantes : une toutes les heures durant 5 à 6 heures soit 6 à 7 séries de mesures.

3.3.8 Gamme étalon de résorufine

Une gamme étalon est préparée à partir d'aliquote de la solution mère à de résorufine :

- Décongeler l'aliquote à l'avance (un bain marie d'eau tiède accélère la décongélation)
- Préparer une solution fille (SF) à 100 μM dans du DMSO
- A partir de la SF préparer une gamme étalon concentrée en tube de verre dans du DMSO
- Transférer 1 $\mu\text{l/ml}$ de chaque concentration dans de l'eau d'essai (FOS290)
- Transférer 2 ml de chacune de cette gamme aqueuse de résorufine dans une plaque 24 puits
- Lire la plaque au fluorimètre de la même façon qu'une plaque « échantillons ». Une mesure en début et en fin de cinétique suffit à évaluer la dégradation de la résorufine au cours de la journée. Des valeurs moyennes seront être utilisées comme gamme étalon.

Tableau 2 : Exemple de gamme étalon de résorufine.

DMSO				Eau	
DMSO (μl)	DMSO (μl) de SF 100 μM	Conc. (μM)		Conc. (μM)	
950	50	5	1 $\mu\text{l/ml}$ dans du FOS ₂₉₀	0,005	
925	75	7,5		0,0075	
900	100	10		0,01	
750	250	25		0,025	
500	500	50		0,05	
250	750	75		0,075	

3.3.9 Euthanasie des prolarves

Pour une euthanasie à 100 mg.L^{-1} préparer une solution mère à 6 g.L^{-1} I puis introduire 5 ml de cette solution par bouteille et 33 μl par puit de microplaque. Laisser agir 30min puis comptabiliser les prolarves restantes dans les bouteilles.

3.3.10 Vaisselle

Pour éliminer toute trace de substance organique adsorbée sur la vaisselle de verre (bouteilles, entonnoirs, cristallisoirs), procéder à un rinçage à l'acétone avant et après passage au lave-vaisselle. Choisir un programme intensif de lavage.

3.4 Résultats

3.4.1 Calcul de l'activité EROD

Pour chaque puits de microplaque à chaque temps de la cinétique, calculer la fluorescence résultant de la quantité de résorufine contenue dans le puit.

$$\text{Fluo réso} = \text{Fluo587nm} - \text{Fluo565nm}$$

Pour chaque puits de microplaque établir une régression linéaire (Figure 2 A), passant par zéro entre le temps et les valeurs de fluorescence (Fluo réso). En déduire la pente, c'est-à-dire l'activité EROD en terme d'efflux (UF.h^{-1}).

La qualité de la régression est évaluée à partir du coefficient de détermination R^2 . Pour un R^2 inférieur à 0,8, supprimer ou corriger les points aberrant de la relation. Ces points aberrant peuvent être occasionnés par l'interférence de larves dans les puits au moment de la mesure.

Les activités EROD en UF/h sont converties en fmol/h/larve à l'aide de la pente (Pentereso) de la gamme étalon de résorufine. Le calcul de l' EROD en fentomoles de résorufine produite par heure et par larve est donc le suivant :

$$\text{EROD (fmol.h}^{-1}\text{.larve}^{-1}) = (\text{EROD (UF.h}^{-1}) / \text{Pentereso}) * (\text{volume puit} / 10)$$

Pour chaque groupe expérimental (6 puits) calculer la moyenne et l'écart type et comparer les groupes entre eux graphiquement ou à l'aide d'un test non paramétrique

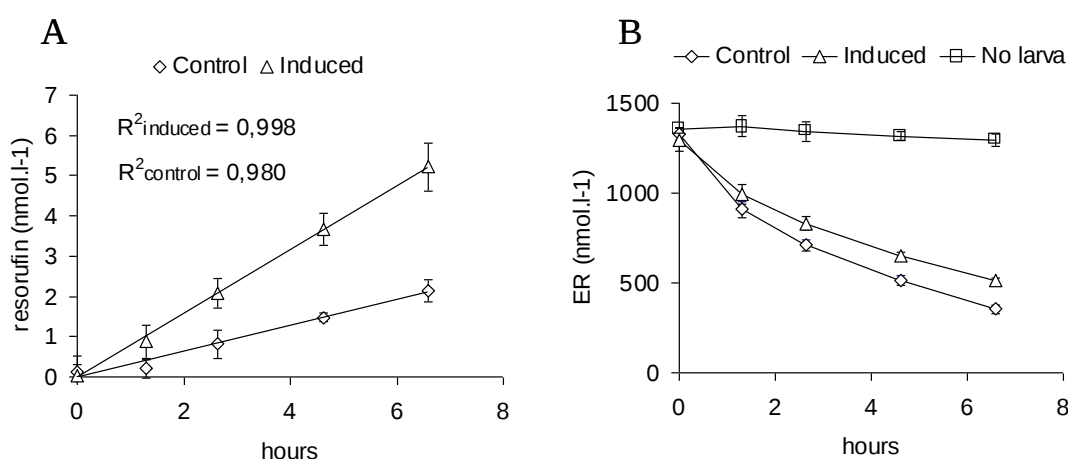


Figure 2: Exemples de cinétiques d'excrétion de résorufine, (A) et d'assimilation d'éthoxyrésorufine (B) ; moyenne et écart type ($N=6$ puits; 10 larve/puit)

3.4.2 Evaluation et interprétation des résultats

On évalue l'essai en comparant les témoins négatifs et positifs aux résultats pondérés d'un panel d'essais antérieurs (carte de contrôle). L'expérience acquise sur la méthode permet déjà de proposer quelques valeurs de référence.

Lors d'un essai la variabilité (écart type) de l'activité EROD entre les 6 puits de microplaque d'un groupe expérimental est en moyenne de 26% +/- 11% pour le témoin eau, 18% +/- 14% pour le témoin BaP 3 µg.L⁻¹ et de 16% +/- 8% pour le témoin BaP30 µg L⁻¹. Cette variabilité est de 18% +/- 8 % pour des extraits de sédiments. Ces estimations proviennent des résultats de 14 essais réalisés en 2007 et 2008 : 14 groupes expérimentaux pour chaque catégorie de témoins ; 133 groupes pour les extraits de sédiments.

Tout groupe dont l'activité EROD est significativement supérieure au témoin négatif est alors considéré comme induit, une induction de 1,5 pouvant être significative si la variabilité intra-groupe est modérée.

Le témoin solvant ne doit pas quant à lui présenter d'induction tandis que les témoins BaP 3 et 30 µg.L⁻¹ présentent des inductions respectives d'environ X2 et X4 dans la majorité des cas : les moyennes des activités sont de 107 +/- 24 fmol.h⁻¹.larve⁻¹ pour le témoin eau, 228 +/- 44 fmol.h⁻¹.larve⁻¹ pour le témoin BaP 3 µg/l et 408 +/- 90 fmol.h⁻¹.larve⁻¹ pour le témoin BaP 30 µg.L⁻¹.

A noter qu'avec des extraits de sédiments le rapport d'induction maximum est de 7X. Concernant les quelques eaux naturelles et effluents testés l'induction n'atteint pas 2X et une forte toxicité entraîne parfois des mortalités, sinon de fortes variabilités intra groupe.

L'interprétation des résultats peut être facilitée en catégorisant les échantillons au sein de 4 classes issues des résultats des témoins positifs et négatifs de l'essai en cours. Cependant cette classification s'avère à l'usage peut discriminante.

Tableau 3 : Classes de toxicité des activités EROD

Classes	Valeur numérique associée
non significativement différent du témoin	1
<= 3 µg/l BaP	2
> 3µg/l BaP <30µg/l BaP	3
>= 30 µg/l BaP	4

Un «équivalent toxique BaP » plus ajusté peut aussi être calculé au moyen de la relation suivante illustrée à la Figure 3:

$$Y = a \ln(X) + b$$

$$Y = 47,911 \ln(X) + 135,31$$

$$Y = \text{rapport d'induction} = [\text{Activité BaP (fmol/h/larve)} / \text{Activité eau (fmol/h/larve)}] * 100$$

X : Concentration en BaP (µg/l)

Au moyen d'un nouveau test à plusieurs concentration en BaP, les paramètres a et b seront actualisés au moins pour chaque nouveau lot de géniteur.

L'équivalent BaP ($\mu\text{g/l}$) obtenu peut ensuite être rapporté à l'équivalent de sédiment sec (mg/l) introduit dans le milieu d'essai par le biais de l'extrait afin d'obtenir un équivalent BaP par milligramme de sédiment ($\mu\text{g-BaP-eq. /mg-sédiment-eq}$)

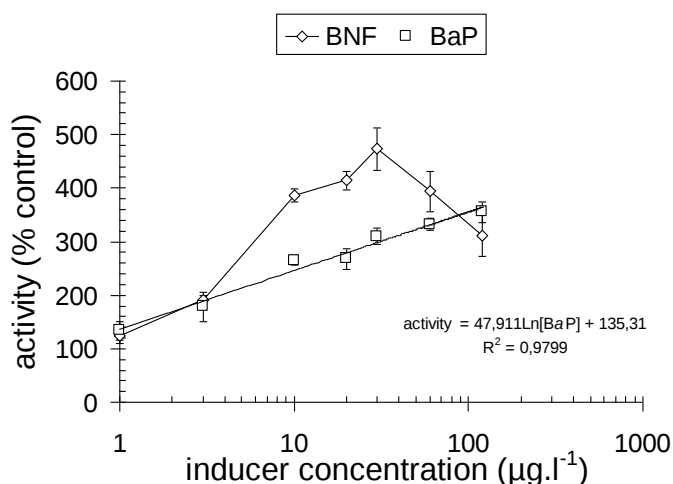


Figure 3: Relation effet vs concentration après exposition au BaP et à la βNF ; moyenne et intervalle de confiance à 95 % ($N=6$ puits; 10 larves/puit)

3.4.3 Rapport d'essai

Toutes les variables susceptibles d'influencer l'activité EROD doivent être mentionnées dans le rapport d'essai :

- Le lot et l'origine des géniteurs
- Volume d'essai et nombre initial d'embryon par bouteille
- La nature du solvant pour les extraits
- Le taux de dilution de l'échantillon
- La procédure d'extraction pour les extraits
- Le taux d'œufs blanc à 24h
- Le nombre de larves non encore écloses à 96h (retard à l'éclosion)
- Le nombre total de larves survivantes à 96h (toxicité de l'échantillon)
- Aspect et mobilité des larves à 96h
- La physico-chimie dans chaque bouteille (pH, O₂, Conductivité, NO₂, NH₄, NH₃) particulièrement pour les eaux naturelles et les effluents

- Traitement préalable éventuel de l'échantillon (strippage, ajustement de pH, filtration...)

4 SYNTHÈSE DU DOCUMENT

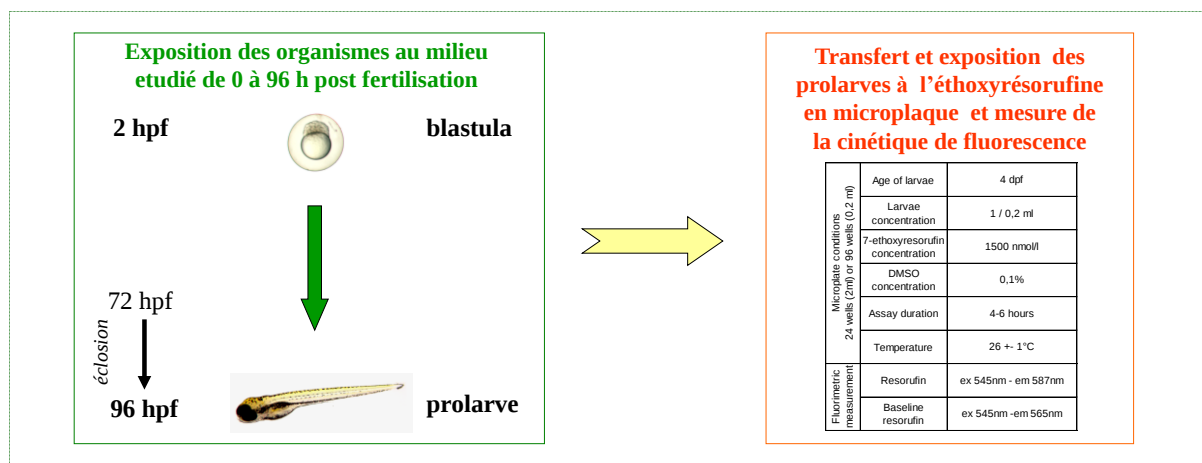


Figure 4 : Schéma récapitulatif de la procédure

Fin du document