



**Section 2**  
**Effets sur les systèmes biologiques**

**Essai n° 251:**  
Essai de détection rapide d'un  
rapporteur de l'activité de perturbation  
androgénique (RADAR)

30 juin 2022

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



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

### Essai de détection rapide d'un rapporteur de l'activité de perturbation androgénique (RADAR)

#### INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice relative à l'essai RADAR (*Rapid Androgen Disruption Activity Reporter*) décrit un essai aquatique faisant appel à des éléuthéroembryons d'*Oryzias latipes* (*O. latipes*, médaka japonais) transgénique au jour zéro après éclosion (J0 ; voir Annexe 1 pour les abréviations), dans un format multipuits, afin de détecter les produits chimiques agissant sur l'axe androgénique. La méthode RADAR a été conçue comme un outil de dépistage pour des essais à court terme visant à mesurer la réponse d'éléuthéroembryons à des produits chimiques potentiellement actifs sur l'axe androgénique (Muschket et al., 2018 ; Ogino et al., 2020 ; Sébillot et al., 2014). Destinée au dépistage chez les poissons, elle permet de classer les produits chimiques en produits potentiellement actifs ou inactifs sur l'axe androgénique, mais elle n'est pas conçue pour la détermination des niveaux de toxicité en vue de l'évaluation des risques (p. ex. concentration sans effet observé [CSEO] ou CE<sub>x</sub> [voir Annexe 1]). L'essai RADAR est placé au niveau 3 du cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais des perturbateurs endocriniens (OCDE, 2018). Le document-guide 150 de l'OCDE fournit des indications complémentaires pour l'interprétation et l'extrapolation entre taxons des résultats de l'essai RADAR (OCDE, 2018).

2. L'espèce sélectionnée pour l'essai RADAR est le poisson médaka japonais, *O. latipes*. Les récepteurs des œstrogènes (*estrogen receptors* – ER) et les récepteurs des androgènes (*androgen receptors* – AR) du médaka japonais présentent une conservation conformationnelle par comparaison avec les récepteurs humains (Cui et al., 2009). Cette espèce est également utilisée dans un certain nombre de Lignes directrices validées de l'OCDE, notamment les suivantes : LD 203 (essai de toxicité aiguë chez le poisson ; OCDE, 2019a), LD 210 (essai de toxicité aux premiers stades de la vie chez le poisson ; OCDE, 2013), LD 212 (essai de toxicité à court terme chez le poisson aux stades de l'embryon et de l'alevin ; OCDE, 1998), LD 229 (essai à court terme de reproduction des poissons ; OCDE, 2012), LD 230 (essai de 21 jours sur les poissons ; OCDE, 2009),

LD 234 (essai de développement sexuel des poissons ; OCDE, 2011B) et LD 240 (étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez médaka ; OCDE, 2015).

3. L'essai RADAR repose sur la transcription et utilise une lignée transgénique de médaka japonais, porteuse de la construction génétique *spg1-gfp*. Dans cette construction génétique, le promoteur du gène *spiggin 1* est couplé à un gène rapporteur de la protéine fluorescente verte (*Green Fluorescent Protein – GFP*). La protéine Spiggin est une glycoprotéine (protéine d'adhésion semblable à la mucine) sécrétée dans le rein de l'épinoche à trois épines mâle sexuellement mature (*Gasterosteus aculeatus*), qui lui sert à construire un nid (Jakobsson et al., 1999). Borg et al. [1993] ont établi que ce processus était contrôlé par les androgènes, le plus puissant étant la 11-kétotestostérone (11-KT), après injection d'une série de stéroïdes à des mâles castrés. Une technique ELISA a été développée pour le dosage de la Spiggin, mettant en évidence la capacité des épinoches femelles à synthétiser cette protéine lorsqu'elles sont exposées à des androgènes exogènes, alors que, dans des conditions normales, leurs niveaux de Spiggin circulante sont proches des limites de détection à la fois *in vivo* (Katsiadaki et al, 2002a ; 2002b ; Hahlbeck et al., 2004) et *ex vivo* (Jolly et al., 2009), ce qui prouve que la Spiggin est un biomarqueur d'intérêt pour les androgènes. Un essai de détection des antiandrogènes a ensuite été mis au point (Katsiadaki et al, 2006), puis validé (OCDE, 2010a), et a donné lieu au document-guide 148 de l'OCDE (OCDE, 2011a). Le gène *spiggin 1* est propre à l'épinoche. Un seul homologue des gènes *spiggin* de l'épinoche est présent dans au moins quelques génomes de téléostéens, dont le médaka japonais, même si l'on sait très peu de choses sur ces gènes homologues. Un seul orthologue de la famille de gènes *spiggin* de l'épinoche, *muc19*, a également été identifié chez les mammifères (Kawahara et Nishida, 2007).

4. La lignée transgénique *spg1-gfp* utilisée dans l'essai RADAR est porteuse de 4.159 kb du promoteur du gène *spiggin 1* de l'épinoche à trois épines, immédiatement en amont du codon d'initiation induisant l'expression de la séquence codante de la GFP. Le transgène *spg1-gfp* reproduit fidèlement la spécificité tissulaire du gène *spiggin 1* chez le médaka japonais, telle qu'elle s'observe chez l'épinoche à trois épines, avec une expression de la GFP strictement limitée au rein en développement (mésonéphros). Il a également été prouvé que l'expression du transgène est sensiblement inhibée en réponse aux œstrogènes (OCDE, 2022). L'utilisation de la Spiggin comme biomarqueur avait déjà permis de constater que les œstrogènes exercent un effet antiandrogénique à la fois *in vitro* et *in vivo* (OCDE, 2011a ; Jolly et al., 2009 ; Katsiadaki et al., 2006). Le puissant effet antiandrogénique des œstrogènes est étayé par d'autres essais *in vitro* (p. ex. Sohoni et Sumpter, 1998) et a également été observé pendant la caractérisation de l'essai RADAR (Sébillot et al., 2014). L'activation du promoteur du gène *spiggin 1* étant une étape terminale de la signalisation de l'axe androgénique, la quantité de Spiggin produite chez une épinoche à trois épines ou la quantité de GFP produite dans le modèle de médaka japonais *spg1-gfp* représente les effets globaux ou nets des facteurs tant endogènes qu'exogènes modifiant la signalisation de l'axe androgénique (changements dans la production, le transport, le métabolisme et l'excrétion des hormones ainsi que dans l'activation et l'inhibition des AR).

5. Avant de pratiquer l'essai RADAR, le laboratoire vérifiera qu'il dispose des certifications éventuellement requises par la réglementation locale sur l'utilisation d'organismes transgéniques. L'essai RADAR doit être réalisé uniquement sur la lignée transgénique *spg1-gfp* utilisée pour l'élaboration de la présente Ligne directrice, qui est disponible dans le commerce (OCDE, 2022). Le recours à une autre lignée transgénique basée sur le promoteur du gène *spiggin 1* induisant l'expression de la GFP ou à un autre

gène rapporteur nécessite une validation complète par l'OCDE afin d'adapter les critères de validité, l'analyse statistique et les seuils de fluorescence utilisés dans le diagramme de décision. C'est pourquoi d'autres lignées transgéniques ne peuvent pas être considérées comme appropriées pour la mise en œuvre de l'essai RADAR.

6. La présente proposition de Ligne directrice repose sur une étude de validation interlaboratoire internationale conduite entre 2019 et 2020 (OCDE, 2022). L'essai a été validé dans cinq laboratoires avec huit substances d'essai monoconstituants et une série de concentrations de 17 $\alpha$ -méthyltestostérone (17MT) et de flutamide, incluses dans chaque expérience réalisée lors de l'exercice de validation. Il convient de noter que l'un des cinq laboratoires n'a mis à l'essai que cinq produits chimiques sur huit.

7. L'effet mesuré est l'induction de fluorescence chez des éléuthéroembryons. Lorsque la transcription de la construction génétique est activée ou inhibée à la suite de l'exposition à un produit chimique, les éléuthéroembryons expriment plus ou moins de GFP et émettent donc plus ou moins de fluorescence, comparés au groupe témoin correspondant.

8. Le produit chimique est mis à l'essai en présence et en l'absence de 3  $\mu$ g/L de 17MT, servant d'agoniste des AR. Les niveaux d'androgènes circulants demeurant très faibles au stade éléuthéroembryonnaire, l'ajout de 17MT au milieu d'essai permet la détection de substances affectant la disponibilité de la 17MT ou antagonistes des AR. La concentration de 17MT utilisée pour le cotraitement a été déterminée de manière empirique en effectuant des essais à différentes concentrations de 17MT (3  $\mu$ g/L et 5  $\mu$ g/L). La concentration choisie (3  $\mu$ g/L) est celle ayant présenté la plus grande sensibilité aux produits chimiques de référence à la fois pro- et antiandrogéniques. Le changement induit dans l'expression du gène par la combinaison de 17MT et du produit chimique d'essai est donc un phénomène obtenu en laboratoire, non observé en l'absence de 17MT exogène à ce stade du développement, et qui n'est par conséquent pas présent chez les individus et les populations de poissons à l'état naturel. Cependant, cela permet l'identification des produits chimiques d'essai agissant par des modes d'action qui ne seraient pas identifiés comme tels en l'absence d'un androgène aromatisable, par exemple les modifications de l'activité de l'aromatase ou de la 5 $\alpha$ -réductase ou l'antagonisme des AR.

## REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

9. L'essai mesure la capacité d'un produit chimique à activer ou à inhiber la transcription de la construction génétique *spg1-gfp*, soit directement par l'établissement d'une liaison avec les AR ou la modification de la liaison entre androgènes et AR, soit indirectement en modifiant la quantité d'androgènes disponibles pour activer les AR et donc la transcription de la construction *spg1-gfp*. À ce jour, il est établi que l'essai RADAR détecte les produits chimiques agissant par différents mécanismes d'action, notamment les suivants : agonistes des AR (p. ex. 17MT, 17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -dihydrotestostérone [mDHT]) ; antagonistes des AR (p. ex. flutamide, linuron, fénitrothion) ; modulateurs de la clairance des androgènes, y compris inhibiteurs de l'aromatase (p. ex. anastrozole et fadrozole), modulateurs de la transcription de l'aromatase (p. ex. prochloraze) et action inhibitrice des

œstrogènes sur l'axe androgénique (p. ex. par induction de l'expression de l'aromatase ou antagonisme des AR par les œstrogènes) ; modulateurs du métabolisme des androgènes, y compris inhibiteurs de la 5 $\alpha$ -réductase (p. ex. dutastéride) et produits chimiques nécessitant une activation métabolique (la vinclozoline ainsi que ses métabolites M1 et M2, par exemple, sont des antagonistes des AR) (OCDE, à paraître ; Sébillot et al., 2014). Il est en outre possible que les modulateurs du transport des androgènes contribuent aux résultats d'ensemble de l'essai RADAR en interagissant avec les protéines de liaison plasmatiques. L'essai RADAR ne permet pas de distinguer les différents modes d'action, mais indique si un produit chimique joue globalement le rôle d'activateur ou d'inhibiteur de l'axe androgénique chez les éléuthéroembryons *O. latipes*. La transcription de la construction *spg1-gfp* nécessitant l'action directe des AR sur le promoteur *spiggin 1*, l'essai RADAR n'est pas conçu pour détecter les produits chimiques affectant la signalisation des AR lorsque celle-ci passe par d'autres voies de signalisation ne conduisant pas à une modification de l'interaction entre les AR et l'ADN (« actions non génomiques »).

10. Un certain nombre de publications permettent d'étayer l'idée que les premiers stades de la vie du médaka sont métaboliquement compétents, même si les données actuelles sont insuffisantes pour déterminer l'ampleur de cette compétence métabolique. Il a été démontré que l'embryon de médaka était capable de transformer le benzo(a)pyrène (BaP) en métabolites, y compris le BaP-3-glucuronide (Hornung et al., 2007), avant la formation du foie. Une forte activité du cytochrome P450 (CYP) 1A a également été identifiée dans le foie, les branchies et d'autres organes du médaka à J1 (Kashiwada et al., 2007). Par ailleurs, l'expression du CYP3A40 s'observe tout au long du développement du médaka et celle du CYP3A38 (forme post-embryonnaire) dès le premier jour après éclosion (Kullman et Hinton, 2001). La vinclozoline nécessite une activation métabolique, l'antagonisme des AR se produisant sous l'effet des métabolites M1 et M2. La concentration minimale avec effet observé (CMEO) obtenue dans l'essai RADAR pour la vinclozoline (143  $\mu\text{g/L}$  ; Sébillot et al., 2014) est comparable à celle obtenue pendant la validation interlaboratoire du dépistage chez la femelle épinoche androgénisée (100  $\mu\text{g/L}$  ; OECD, 2010a).

11. La présente Ligne directrice repose sur la quantification de la fluorescence dans tout l'éléuthéroembryon. Cette méthode a notamment pour limite de ne pas être applicable à des produits chimiques émettant une fluorescence entre 500 et 550 nm ( $\lambda_{\text{EM}} = 500\text{-}550\text{ nm}$ ) lorsqu'ils sont excités à des longueurs d'onde comprises entre 450 et 500 nm ( $\lambda_{\text{EX}} = 450\text{-}500\text{ nm}$ ), et qui sont fluorescents dans les éléuthéroembryons. Les produits chimiques présentant ces deux propriétés peuvent induire une fluorescence qui risque d'être interprétée comme un signal GFP, ce qui pourrait conduire à les identifier à tort comme des produits agissant sur l'axe androgénique. Un protocole simple permettant de déterminer si le produit chimique d'essai émet une fluorescence est proposé au §29. Ce protocole requiert l'utilisation d'éléuthéroembryons *O. latipes* de type sauvage.

12. L'essai RADAR ne doit pas être utilisé pour la mise à l'essai de produits chimiques ne relevant pas de son domaine d'applicabilité. Si la mise à l'essai de mélanges ou de produits chimiques difficiles à tester est envisagée, il convient de s'interroger sur la validité scientifique des résultats d'un tel essai. Si la Ligne directrice est utilisée pour soumettre à l'essai un mélange, un produit UVCB (substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques) ou une substance multiconstituant, il convient, dans la mesure du possible, d'en caractériser la composition en déterminant, par exemple, l'identité chimique de ses constituants, leur teneur ainsi que leurs propriétés spécifiques. Le document-guide n° 23 (OCDE, 2019b) contient des

recommandations relatives aux essais de produits chimiques difficiles à tester (tels que mélanges, UVCB ou substances multiconstituants). La méthode décrite dans la présente Ligne directrice n'est pas adaptée à la mise à l'essai de produits chimiques volatils.

## PRINCIPE DE L'ESSAI

### Plan expérimental général

13. Le plan expérimental général consiste à exposer des éléuthéroembryons de médaka japonais transgénique *spg1-gfp* à J0 dans des plaques six puits pendant 72 h à un produit chimique d'essai en présence (« mode enrichi (avec ajouts dosés) ») et en l'absence (« mode non enrichi (sans ajouts dosés) ») d'un cotraitement avec 3 µg/L de 17MT. Chaque expérience doit comporter cinq épreuves indépendantes. Pour chaque épreuve, il est recommandé d'utiliser au moins cinq concentrations ainsi que les témoins non optionnels (un témoin milieu d'essai et/ou témoin solvant ; deux témoins 17MT ; un témoin 17MT + flutamide). L'essai nécessite 20 éléuthéroembryons répartis dans quatre puits (5 organismes par puits) par condition d'essai (concentrations d'essai et témoins), en régime semi-statique. La solution d'exposition doit être renouvelée chaque jour (c'est-à-dire après 24 h et 48 h). Tous les puits des plaques six puits peuvent être utilisés. Les produits chimiques volatils étant exclus, le fait d'avoir deux groupes différents de produits chimiques ou de témoins sur la même plaque ne pose pas de problème. Comme chacune des trois épreuves comprend cinq concentrations d'essai et les témoins non optionnels, incluant soit un témoin milieu d'essai soit un témoin solvant, l'essai RADAR utilisera 280 éléuthéroembryons par épreuve ; il faudra donc 840 éléuthéroembryons pour l'ensemble des trois épreuves constituant une expérience (voir Graphique 1 et §15). L'essai mesure la fluorescence de la GFP chez les éléuthéroembryons transgéniques *spg1-gfp* par imagerie de fluorescence, qui transforme le signal de fluorescence en donnée numérique. Une présentation détaillée des conditions d'essai figure à l'Annexe 2.

### Témoins

14. L'essai RADAR requiert les groupes témoins suivants, qui auront tous la même concentration de solvant organique (si l'on en utilise un). La présente Ligne directrice a été validée en utilisant exclusivement du diméthylsulfoxyde (DMSO), à une concentration finale de 0.2 %. Si possible, il vaut mieux ne pas utiliser de solvant ou utiliser une concentration maximale de solvant de 100 mg/L (0.01 %), conformément aux indications du document-guide 23 de l'OCDE (OCDE, 2019b).

- Témoin milieu d'essai et/ou solvant : 4 puits avec 5 organismes par puits sont exposés au milieu d'essai. Ce témoin définit le niveau de fluorescence de base dans le milieu d'essai. Si un solvant est utilisé, ce groupe est exposé au milieu d'essai ainsi qu'au solvant à la même concentration que tous les autres groupes. Dans

certains cas, notamment quand on ne dispose pas de données historiques sur le solvant, les deux groupes peuvent s'avérer nécessaires.

- 17MT 3 µg/L : 4 puits avec 5 organismes par puits sont exposés à 3 µg/L de 17MT. Ce témoin établit le niveau de fluorescence pour une concentration de 17MT de 3 µg/L. Il peut être inclus dans la courbe d'étalonnage de 17MT si les témoins optionnels décrits ci-dessous sont utilisés, permettant ainsi de lire, pour tout produit chimique d'essai proandrogénique, une valeur d'équivalence avec 17MT sur la courbe d'étalonnage. La détermination de valeur d'équivalence avec 17MT est facultative.
- 17MT 10 µg/L : 4 puits avec 5 organismes par puits sont exposés à 10 µg/L de 17MT. Ce témoin établit le niveau de fluorescence pour une concentration de 17MT de 10 µg/L. Il peut être inclus dans la courbe d'étalonnage de 17MT si les témoins optionnels décrits ci-dessous sont utilisés, permettant ainsi de lire, pour tout produit chimique d'essai proandrogénique, une valeur d'équivalence avec 17MT sur la courbe d'étalonnage. La détermination de valeur d'équivalence avec 17MT est facultative.
- 17MT 3 µg/L + flutamide 500 µg/L : 4 puits avec 5 organismes par puits sont exposés à 500 µg/L de flutamide en présence de 3 µg/L de 17MT. Ce témoin établit l'inhibition de la fluorescence pour une concentration de flutamide de 500 µg/L par rapport au groupe témoin exposé uniquement à une concentration de 17MT de 3 µg/L. Il est inclus dans la courbe d'étalonnage du flutamide si les témoins optionnels décrits ci-dessous sont utilisés, permettant ainsi de lire, pour tout produit chimique d'essai ayant une activité antiandrogénique en mode enrichi (présence de 3 µg/L de 17MT), une valeur d'équivalence avec le flutamide, en tant qu'antagoniste des AR, sur la courbe d'étalonnage.

Le calcul des valeurs d'équivalence n'est pas requis et n'a qu'un but informatif, le résultat de l'essai visant uniquement à établir si le produit chimique est actif ou inactif. Si les valeurs d'équivalence sont calculées, les témoins optionnels ci-dessous doivent être inclus dans chaque épreuve.

Les groupes témoins supplémentaires suivants sont facultatifs, mais sont recommandés pour l'étalonnage des paramètres de lecture dans des laboratoires n'ayant jamais réalisé cet essai auparavant ainsi qu'à des fins de contrôle de la qualité.

- 17MT 1.5 µg/L : 4 puits avec 5 organismes par puits sont exposés à 1.5 µg/L de 17MT. Ce témoin établit le niveau de fluorescence pour une concentration de 17MT de 1.5 µg/L. Il est inclus dans la courbe d'étalonnage de 17MT, permettant ainsi de lire, pour tout produit chimique induisant la signalisation de l'axe androgénique, une valeur d'équivalence avec 17MT sur la courbe d'étalonnage.
- 17MT 3 µg/L + flutamide 167 µg/L : 4 puits avec 5 organismes par puits sont exposés à 167 µg/L de flutamide en présence de 3 µg/L de 17MT. Ce témoin établit l'inhibition de la fluorescence pour une concentration de flutamide de 167 µg/L par rapport au groupe témoin exposé uniquement à une concentration de 17MT de 3 µg/L. Il est inclus dans la courbe d'étalonnage du flutamide.
- 17MT 3 µg/L + flutamide 55.6 µg/L : 4 puits avec 5 organismes par puits sont exposés à 55.6 µg/L de flutamide en présence de 3 µg/L de 17MT. Ce témoin établit

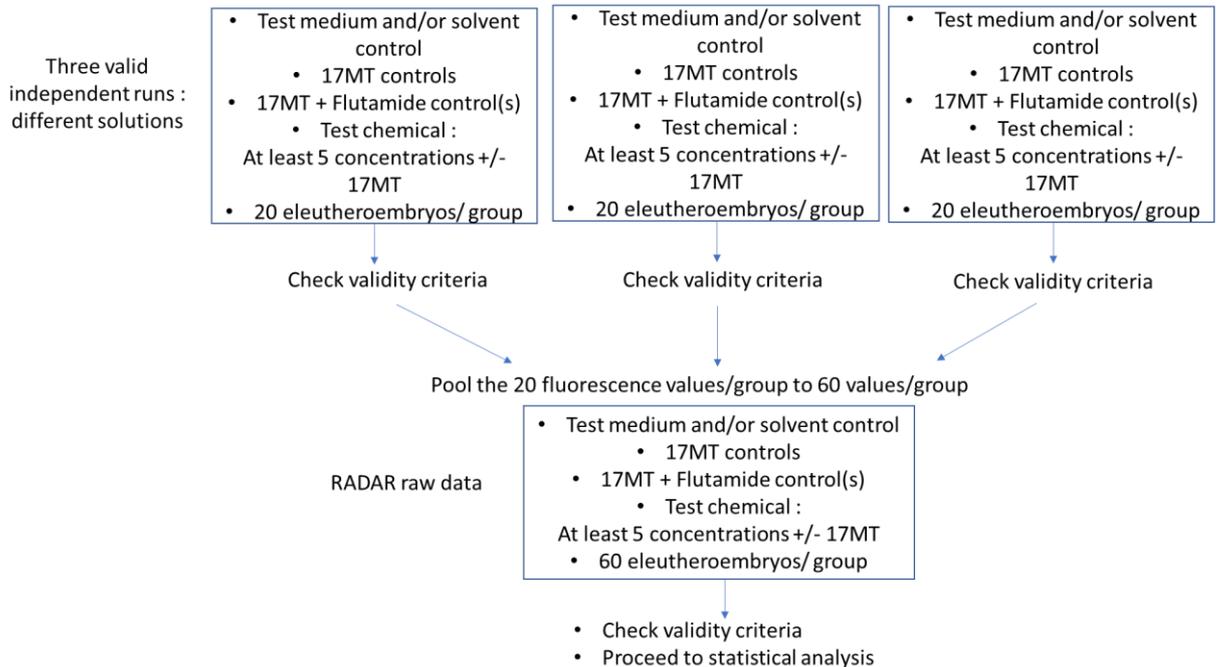
l'inhibition de la fluorescence pour une concentration de flutamide de 55.6 µg/L par rapport au groupe témoin exposé uniquement à une concentration de 17MT de 3 µg/L. Il est inclus dans la courbe d'étalonnage du flutamide.

- 17MT 3 µg/L + flutamide 18.5 µg/L : 4 puits avec 5 organismes par puits sont exposés à 18.5 µg/L de flutamide en présence de 3 µg/L de 17MT. Ce témoin établit l'inhibition de la fluorescence pour une concentration de flutamide de 18.5 µg/L par rapport au groupe témoin exposé uniquement à une concentration de 17MT de 3 µg/L. Il est inclus dans la courbe d'étalonnage du flutamide.

Si l'essai est réalisé avec un solvant, tous les groupes de produits chimiques et de témoins doivent recevoir une concentration égale de solvant. Il convient en outre de déterminer si les résultats obtenus pour les groupes témoins remplissent les critères de validité avec le système d'imagerie utilisé pour la lecture ; si ce n'est pas le cas, l'expérience est considérée comme invalide (voir également §36).

### Épreuves expérimentales

15. Un essai comprend trois épreuves indépendantes valides, et nécessite 4 puits contenant chacun 5 organismes par groupe de traitement et par épreuve (voir Graphique 1). Au moins cinq concentrations du produit chimique d'essai sont évaluées en présence et en l'absence de 17MT. Les mêmes concentrations doivent être évaluées dans chaque épreuve. On utilisera des solutions indépendantes pour chaque épreuve (voir §40). Les épreuves sont conduites séquentiellement avec des éluthéroembryons éclos à des jours différents. Les données brutes relatives à un produit chimique d'essai sont obtenues en réunissant les données des trois épreuves, ce qui correspond idéalement à un total de  $n = 60$  valeurs de fluorescence pour chaque groupe de traitement. Le regroupement des données est obligatoire dans le cadre de cet essai et n'est pas uniquement effectué dans les cas où les trois épreuves donnent une réponse positive. Il sert à fournir une meilleure estimation de la valeur de fluorescence moyenne pour chaque groupe expérimental.



**Graphique 1. Aperçu de l'essai RADAR.** (« +/- 17MT » désigne les groupes avec/sans ajouts dosés.) Un essai RADAR comporte trois épreuves indépendantes et utilise 840 éléuthéroembryons au total. Tous les témoins non optionnels doivent être inclus dans chaque épreuve (voir §14). Si un solvant est utilisé pour la première fois ou pour la première fois à une certaine concentration, un témoin milieu d'essai doit également être inclus (voir §51).

## INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

16. Les informations disponibles sur le produit chimique d'essai doivent figurer dans le rapport (voir §57).

17. Si possible, la solubilité du produit chimique dans le milieu d'essai doit être connue et il convient de disposer d'une méthode analytique validée, dont on connaît l'exactitude, la précision et la sensibilité, pour le dosage du produit dans les solutions d'essai, avec indication du rendement de récupération et de la limite de quantification. De plus amples informations sur la validation des méthodes d'analyse quantitative figurent dans le document-guide 204 (OCDE, 2014b). La détermination analytique de la concentration de produit chimique d'essai sera effectuée conformément aux modalités décrites au §41.

## DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

### Quantification de la fluorescence

18. L'essai RADAR repose sur la quantification de la fluorescence émise par chaque organisme. Pour garantir une quantification adéquate et exacte, il convient de procéder à des expériences préalables. Celles-ci ont pour finalité d'étalonner le système d'imagerie de fluorescence et de s'assurer qu'il permet la lecture d'une plage dynamique adaptée de mesures de fluorescence. Elles sont décrites à l'Annexe 3. Si un autre système de mesure de la fluorescence est utilisé, il doit être étalonné et validé de la même manière qu'un système d'imagerie de fluorescence (Annexe 3). Cependant, l'utilisation d'un microscope à fluorescence équipé d'une caméra appropriée est la méthode à privilégier, car elle offre la possibilité d'une étape de contrôle de qualité des images, permettant d'identifier les éléuthéroembryons mal placés ou un signal de fluorescence sans lien avec l'activation de l'axe androgénique (poussières ou fibres fluorescentes, produit chimique d'essai fluorescent dans les éléuthéroembryons, profil de fluorescence anormal).

### Substances d'épreuve de compétence

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

**Tableau 1. Substances d'épreuve de compétence : mDHT, linuron, céfuroxime et cromolyn. Les limites de signification statistique attendues concernent la fluorescence du groupe exposé à la concentration indiquée du produit chimique de référence par rapport au témoin correspondant. Ces limites ont été établies lors de l'exercice de validation de l'essai RADAR par l'OCDE (OCDE, 2022).**

Produit chimique	N° CAS	Catégorie	Concentrations d'essai	Limite de signification statistique attendue
mDHT	521-11-9	Actif	16, 8, 4, 2, 1 µg/L	4 µg/L
Linuron	330-55-2	Actif	2.5, 1.25, 0.625, 0.31, 0.16 mg/L	1.25 mg/L
Céfuroxime	56238-63-2	Inerte	10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mg/L	Inerte
Cromolyn	15826-37-6	Inerte	1000, 100, 10, 1, 0.1 µg/L	Inerte

## CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

20. Pour que les résultats de l'essai soient valides, les critères suivants doivent être remplis pour chaque épreuve. Si ce n'est pas le cas, l'épreuve est considérée comme invalide.

- Une induction de fluorescence statistiquement significative doit être mesurée entre le groupe témoin solvant et le groupe témoin 17MT 10 µg/L. La fluorescence moyenne du groupe témoin 17MT 10 µg/L doit représenter au moins 300 % de la fluorescence moyenne du groupe témoin milieu d'essai ou du groupe témoin solvant si un solvant est utilisé.
- La mortalité combinée et/ou les malformations ainsi que les données invalides dues aux éléuthéroembryons mal positionnés (voir Annexe 7) ne doivent pas excéder 10 % dans chaque groupe témoin et dans au moins cinq groupes de traitement en présence et en l'absence de 17MT. Les groupes ne répondant pas à ces critères sont considérés comme compromis.

Pour que les résultats de l'essai soient valides, les critères suivants doivent être remplis pour l'ensemble des trois épreuves réunies. Si ce n'est pas le cas, les trois épreuves sont considérées comme invalides.

- La fluorescence moyenne du groupe témoin 17MT 10 µg/L doit être au moins 10 % supérieure à la fluorescence moyenne du groupe témoin 17MT 3 µg/L. Cela garantit que la fluorescence moyenne du groupe 17MT 10 µg/L est supérieure à celle du groupe 3 µg/L, les données historiques faisant ressortir l'importance de cet élément pour s'assurer du bon déroulement de l'essai. En général, la différence est très supérieure à 10 %.
- Une inhibition de la fluorescence statistiquement significative doit être mesurée entre le groupe témoin 17MT 3 µg/L et le groupe témoin 17MT 3 µg/L + flutamide 500 µg/L.
- Pour les trois épreuves réunies, au moins cinq concentrations d'essai non compromises sont requises. Un groupe de traitement (idéalement 60 individus) est considéré comme non compromis si, dans chacune des trois épreuves (20 individus par épreuve dans l'idéal), les critères de validité sont remplis (mortalité combinée et/ou malformations ainsi que données invalides dues aux éléuthéroembryons mal positionnés [voir Annexe 7] n'excédant pas 10 %).
- Ces critères de validité s'appliquent après le contrôle de qualité des images s'il est effectué. Si un écart mineur est observé par rapport aux critères de validité, les conséquences doivent être appréciées au regard de la fiabilité des données de l'essai et ces considérations doivent être consignées dans le rapport d'essai.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

### Appareillage

21. On utilise du matériel courant de laboratoire et en particulier :
  - incubateur de laboratoire au tout autre dispositif adéquat de régulation de la température et de la lumière ;
  - plaques transparentes 6 puits pour cultures cellulaires constituées d'un matériau chimiquement inerte ;
  - plaques noires 96 puits à fond transparent certifiées pour la quantification de la fluorescence si l'acquisition des images des éléuthéroembryons se fait par le dessous ou surface en plastique noir adaptée à la quantification de la fluorescence en cas d'acquisition des images par le dessus ;
  - pH-mètre ;
  - stéréomicroscope équipé d'une source lumineuse (pour le tri des œufs fécondés/non fécondés) ;
  - microscope à fluorescence équipé de filtres passe-haut GFP et d'une caméra couleur pour la quantification de la fluorescence (OCDE, 2022) ;
  - logiciel d'analyse d'images ;
  - instruments d'analyse adaptés au produit chimique d'essai ou recours à des services d'analyse extérieurs.

### Organisme d'essai

22. Les organismes utilisés pour l'essai RADAR sont des éléuthéroembryons homozygotes de médaka japonais *O. latipes* de la lignée transgénique *spg1-gfp*. Ces organismes doivent être produits en accouplant deux médakas japonais *spg1-gfp* homozygotes. Plusieurs laboratoires assurent la production de la lignée transgénique *spg1-gfp* (Annexe 10), qui peut être obtenue en signant un accord de licence. Lorsqu'un produit chimique d'essai se révèle fluorescent, des éléuthéroembryons de médaka japonais de type sauvage peuvent également s'avérer nécessaires afin de vérifier si le produit en question est fluorescent dans les éléuthéroembryons (voir §2929).

23. La phase d'exposition de l'essai commence avec des éléuthéroembryons à J0 (approximativement 10 jours après la fécondation à 26 °C). Les éléuthéroembryons doivent être à J0, mais le nombre de jours post-fécondation (JPF) peut varier. Cependant, cette différence ne doit pas dépasser un JPF pour une même épreuve. Les différents groupes d'exposition doivent être constitués d'éléuthéroembryons sélectionnés de manière aléatoire. Les éléuthéroembryons doivent être issus de préférence d'animaux reproducteurs appartenant au laboratoire. Il est toutefois possible de les faire venir d'un autre laboratoire en s'assurant de les recevoir le plus tôt possible dans leur développement, afin de ménager une période de récupération aussi longue que possible avant le début de l'essai. Les modalités d'acclimatation et les critères d'acceptation des lots sont décrits à l'Annexe 4.

24. Les conditions d'hébergement, de reproduction et de soin d'*O. latipes* sont présentées dans un certain nombre de sources, par exemple dans les volumes 1 et 2 de l'ouvrage *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols* (Kinoshita et al., 2009 ; Murata et al., 2019) ou dans les Lignes directrices de l'Agence pour la protection de l'environnement (EPA) des États-Unis relatives à la culture du médaka japonais, *Oryzias latipes*.

25. L'intégrité de la lignée transgénique *spg1-gfp* doit être vérifiée à chaque génération en utilisant un ensemble complet de témoins, y compris les témoins optionnels (§14), et en s'assurant du respect de tous les critères de validité et de l'obtention du profil de réponse attendu pour les témoins 17MT et flutamide (§14).

26. Il convient de procéder une fois par an à un contrôle de qualité du stade de développement d'éléuthéroembryons sélectionnés de manière aléatoire afin de s'assurer qu'ils n'ont pas dépassé le stade 42 à la fin de l'essai.

### Milieu d'essai

27. Le milieu d'essai peut être un milieu médaka (Annexe 5), de l'eau minérale plate dans une bouteille en verre, de l'eau de source, de l'eau de puits ou de l'eau du robinet filtrée sur charbon actif. La qualité de l'eau pouvant varier considérablement d'une région à l'autre, il convient de l'analyser afin de détecter d'éventuels contaminants (notamment métaux lourds) et produits chimiques susceptibles d'interférer avec l'essai, en particulier en l'absence de données historiques montrant que l'eau est appropriée pour l'élevage de l'espèce *O. latipes*. Une attention particulière doit être accordée au cuivre, au chlore et à la chloramine, tous très toxiques pour les éléuthéroembryons *O. latipes*. Il ne faut pas utiliser d'agents chélateurs. Les résultats de l'analyse de la qualité de l'eau seront notés dans le rapport. On trouvera à l'Annexe 5 certaines caractéristiques chimiques d'un milieu d'essai acceptable pour *O. latipes*. Toutefois, tout milieu favorisant une croissance et un développement normaux d'*O. latipes* et permettant de remplir les critères de validité de l'essai est un milieu d'essai approprié.

### Alimentation

28. Des éléuthéroembryons entre les stades de développement J0 (début de l'essai) et J3 (fin de l'essai) sont utilisés pour cet essai. Ils ne sont nourris ni avant ni pendant l'essai, car celui-ci se termine au stade 40 (Iwamatsu, 2004). En effet, du vitellus est encore présent jusqu'au stade 41/42 et utilisé comme source d'énergie pour le développement de l'éléuthéroembryon.

### Détermination de la fluorescence éventuelle du produit chimique d'essai

29. La présente Ligne directrice ne doit pas être appliquée à des produits chimiques d'essai émettant une fluorescence entre 500 et 550 nm ( $\lambda_{EM} = 500-550$  nm) lorsqu'ils sont excités à des longueurs d'onde comprises entre 450 et 500 nm ( $\lambda_{EX} = 450-500$  nm), et susceptibles d'être fluorescents dans les éléuthéroembryons. Les produits chimiques présentant ces deux propriétés peuvent induire une fluorescence qui risque d'être interprétée comme un signal GFP, ce qui pourrait conduire à les identifier à tort comme des produits agissant sur l'axe androgénique. Un protocole simple permettant de déterminer si le produit chimique d'essai émet une fluorescence à ces longueurs d'onde consiste à placer 200  $\mu$ L/puits d'une solution du produit chimique à la concentration la plus élevée prévue

pour l'essai RADAR dans dix puits d'une plaque 96 puits. Dix puits supplémentaires d'une plaque 96 puits doivent ensuite être remplis avec 200 µL/puits de milieu d'essai. La fluorescence est alors quantifiée en utilisant le même appareillage et les mêmes réglages que pour la quantification de la fluorescence de l'éléuthéroembryon. Les différences potentielles de fluorescence entre le milieu d'essai et le produit chimique d'essai doivent être évaluées au moyen d'une analyse statistique. Il convient de commencer par un test de normalité de D'Agostino-Pearson. Si les données de fluorescence suivent une distribution normale aussi bien pour le produit chimique que pour le milieu d'essai, un test T bilatéral doit être effectué afin de déterminer s'il existe une différence de fluorescence statistiquement significative. Si l'un des ensembles de données ou les deux ne suivent pas une distribution normale, il faut réaliser un test de Mann-Whitney. Si un produit chimique fluorescent est identifié, 20 éléuthéroembryons *O. latipes* de type sauvage doivent être exposés à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant  $72 \pm 2\text{h}$ , avec un renouvellement quotidien de la concentration de produit chimique la plus élevée prévue pour l'essai RADAR. La fluorescence doit ensuite être quantifiée et comparée à celle d'un groupe de 20 éléuthéroembryons de type sauvage exposés au milieu d'essai seul dans les mêmes conditions. Une analyse statistique sera menée, comme décrit plus haut dans ce paragraphe, afin de comparer le milieu d'essai au produit chimique d'essai. Si une différence de fluorescence statistiquement significative est observée, cela indique que le produit chimique est fluorescent dans les éléuthéroembryons et ne doit pas être soumis à l'essai RADAR. Si le produit chimique d'essai induit une fluorescence aussi bien en mode enrichi que non enrichi dans un essai RADAR, cela peut vouloir dire qu'il est métabolisé en un métabolite fluorescent. Il convient alors d'examiner les images pour établir si la fluorescence est limitée aux reins. Si ce n'est pas le cas, la procédure décrite plus haut pour l'exposition des éléuthéroembryons de type sauvage doit être appliquée en vue de déterminer si le produit chimique est métabolisé en un métabolite fluorescent.

## Sélection des concentrations d'essai

### Établissement de la concentration d'essai maximale

30. La concentration maximale tolérée (CMT) est définie comme la concentration du produit chimique d'essai la plus élevée entraînant une mortalité  $\leq 10\%$  dans chacune des trois épreuves individuelles. Le laboratoire procédera à un essai de détermination de la gamme des concentrations sur des éléuthéroembryons *O. latipes* pour évaluer la toxicité éventuelle.

31. Cet essai de détermination de la gamme doit comporter au moins trois concentrations d'essai. Celles-ci doivent former une suite géométrique avec un facteur d'espacement ne dépassant pas 10. Seule une épreuve avec 20 éléuthéroembryons est requise pour les concentrations d'essai choisies et le témoin. L'essai de détermination de la gamme est réalisé sur cinq éléuthéroembryons *O. latipes* de type sauvage ou *spg1-gfp* avec 8 mL de solution d'exposition par puits, quatre puits par concentration d'essai et quatre puits pour le témoin. Le pourcentage d'éléuthéroembryons présentant une mortalité (et/ou des malformations) est calculé en combinant les données de l'ensemble des 20 éléuthéroembryons exposés à la même concentration d'essai ou au témoin. La concentration la plus élevée utilisée pour déterminer la gamme doit entraîner plus de 10 % de mortalité combinée (et/ou de malformations), sauf si la concentration d'essai la plus élevée est 100 mg/L ou la limite de solubilité du produit chimique d'essai.

32. La concentration d'essai maximale sera établie en fonction de la plus faible des valeurs suivantes : limite de solubilité du produit chimique dans le milieu d'essai, CMT, concentration maximale induisant plus de 10 % de mortalité combinée et/ou de malformations chez les éléuthéroembryons, ou concentration maximale de 100 mg/L.

### *Gamme de concentrations d'essai*

33. Un minimum de cinq concentrations d'essai remplissant les critères de validité est requis. En règle générale, un facteur d'espacement de 3 à 10 est recommandé entre deux concentrations d'essai adjacentes.

### **Solutions d'essai**

34. Les solutions d'essai aux concentrations retenues sont généralement préparées par dilution d'une solution mère. Le pH de chaque solution d'essai doit être ajusté à une valeur comprise entre 6.5 et 8.0. La préparation des solutions mères s'effectue par dissolution du produit chimique d'essai, par des moyens mécaniques si nécessaire, tels que l'agitation, le brassage, les ultrasons ou toute autre méthode appropriée. Pour la mise à l'essai de produits chimiques difficiles à tester, il convient de consulter le document-guide n° 23 de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique en phase aqueuse des produits chimiques difficiles à tester (OCDE, 2019b).

35. Si possible, il vaut mieux ne pas utiliser de solvant ou utiliser une concentration maximale de solvant de 100 mg/L (0.01 %), conformément aux indications du document-guide 23 de l'OCDE (OCDE, 2019b), s'il est confirmé que le solvant choisi et la concentration de solvant utilisée permettent de remplir tous les critères de validité. Ceux-ci incluent non seulement la survie des éléuthéroembryons, mais aussi la performance des groupes témoins (voir §20).

36. Si un solvant est utilisé, la concentration de solvant doit être la même pour toutes les concentrations d'essai et tous les témoins. Le choix d'un solvant approprié dépend des propriétés physicochimiques du produit chimique d'essai et de la sensibilité d'*O. latipes* vis-à-vis du solvant choisi, qui sera déterminée de préférence lors d'un essai préliminaire. Il faut également tenir compte de l'action éventuelle du solvant sur l'axe de la reproduction (Hutchinson et al., 2006).

37. Les solutions témoins doivent être préparées le premier jour de l'épreuve et soit conservées à 4 °C et utilisées à chaque renouvellement, soit préparées à nouveau chaque jour. Chaque épreuve indépendante nécessite une nouvelle préparation des solutions d'essai et des solutions témoins. Les solutions conservées à 4 °C doivent atteindre  $26 \pm 1$  °C avant leur mise en contact avec les éléuthéroembryons afin de prévenir tout choc thermique. Selon la stabilité du produit chimique d'essai, les solutions d'exposition qui le contiennent doivent être soit préparées le premier jour de l'épreuve et conservées à 4 °C pour être utilisées lors de cette épreuve, soit préparées à nouveau juste avant chaque renouvellement des solutions d'essai. Les dosages analytiques des solutions de renouvellement conservées à 4 °C pendant l'essai doivent reposer sur la solution telle qu'elle est utilisée lors du renouvellement et non telle qu'elle était au moment de sa préparation.

## MODE OPÉRATOIRE

### Conditions d'exposition

38. Les organismes sont exposés dans des plaques 6 puits en plastique chimiquement inertes pour cultures cellulaires (classiquement des puits de 34 mm de diamètre intérieur et 20 mm de hauteur). Chaque puits contient 5 organismes dans 8 mL de solution. Au cours d'une épreuve, 20 organismes sont exposés à chaque concentration d'essai. Chaque groupe témoin comprend aussi 20 organismes (voir §14 pour la liste des groupes témoins). Si des plaques en plastique ne sont pas appropriées pour un produit chimique donné, on les remplacera par des récipients en verre (boîtes de Petri de petit diamètre).

39. Les éléuthéroembryons sont maintenus dans un incubateur pendant  $72 \pm 2$  h à  $26 \pm 1$  °C dans l'obscurité constante pendant toute la durée de l'essai. Cela limite la variabilité technique entre les différents incubateurs et simplifie les exigences pour la réalisation de l'essai. (Si celui-ci était réalisé avec un cycle lumineux, des longueurs d'onde et des intensités spécifiques seraient nécessaires pour limiter la variabilité.) Cela présente également un avantage pour la mise à l'essai de produits chimiques photosensibles.

40. Un nouvel ensemble de solutions d'exposition doit être préparé pour chacune des trois épreuves de l'essai RADAR.

### Dosages analytiques

41. Une méthode de renouvellement semi-statique étant utilisée, la stabilité de la concentration du produit chimique d'essai doit être documentée. Dans l'idéal, la stabilité du produit devrait permettre à la concentration d'exposition de demeurer à  $\pm 20$  % de la concentration nominale pendant 24 h. L'exigence minimale pour les dosages analytiques est l'ensemble minimal d'échantillons scientifiquement valable. Le document-guide n° 23 de l'OCDE fournit des indications sur cette question (OCDE, 2019b). Les périodes de renouvellement de  $24 \pm 2$  h sont les plus longues périodes acceptées. Si les concentrations ne peuvent être maintenues à  $\pm 20$  % dans le système d'essai, il est possible d'envisager des périodes de renouvellement plus courtes. L'utilisation de la moyenne géométrique des concentrations mesurées est autorisée pour les substances qui ne demeurent pas à 80-120 % de la concentration nominale ; voir chapitre 5 du document-guide n° 23 de l'OCDE pour de plus amples détails (OCDE, 2019b).

### Lancement et conduite de l'essai

#### Jour 0

42. L'exposition débute le jour de l'éclosion des éléuthéroembryons (J0 ; approximativement 10 jours après la fécondation à 26 °C).

43. Pour sélectionner les organismes d'essai, on procède à une observation des éléuthéroembryons et ceux qui présentent des malformations nettement apparentes ou des atteintes physiques (p. ex. queue endommagée, œdème, scoliose) sont exclus de l'essai (Annexe 6). Les éléuthéroembryons ayant un aspect sain et normal dans la population de stock doivent être réunis dans un même récipient contenant un volume approprié de milieu d'essai. Les organismes sélectionnés doivent être homogènes en taille ; les

éleuthéroembryons présentant une nette différence de taille sont éliminés. Les lots comportant moins de 80 % d'éleuthéroembryons sains et normaux à J0 ne doivent pas être utilisés pour l'essai. Cette détermination doit avoir lieu au moment de l'élimination des éleuthéroembryons morts et malformés du lot, avant la conduite de l'essai.

44. On commence l'expérience en plaçant 5 éleuthéroembryons/puits dans des plaques 6 puits dans des gouttes de milieu d'essai (voir §27) au moyen d'une pipette de transfert. On retire le milieu d'essai avant d'ajouter les solutions de produit chimique d'essai pour la première fois. Il faut veiller à travailler sur une seule plaque à la fois afin d'éviter le dessèchement des éleuthéroembryons.

### **Jour 1 et jour 2**

45. Les solutions de produit chimique d'essai et les solutions témoins doivent être renouvelées à  $24 \pm 1$  h et  $48 \pm 2$  h. Chaque puits est inspecté en vue d'identifier les organismes ayant une apparence anormale (blessures, comportement natatoire anormal, etc.). Les organismes morts et ceux présentant des malformations manifestes (Annexe 6) ou des blessures doivent être retirés et euthanasiés selon la procédure décrite au §47. Toutes les observations doivent être consignées. Au cours de chaque épreuve, si des effets sublétaux et une mortalité cumulée  $> 10\%$  sont observés dans l'un des groupes témoins ou l'un des groupes de traitement, laissant moins de cinq concentrations d'essai non compromises, l'épreuve indépendante en cours est arrêtée et l'origine de la mortalité ou de l'anomalie doit être identifiée.

### **Jour 3 : quantification de la fluorescence**

46. La fluorescence de chaque organisme est quantifiée après  $72 \pm 2$  h d'exposition. On commence par renouveler les solutions d'essai avec 8 mL de milieu d'essai (voir §27) et on retire les organismes morts ainsi que ceux présentant des malformations manifestes. Toutes les observations doivent être consignées. Si des effets sublétaux et une mortalité cumulée  $> 10\%$  sont observés dans l'un des groupes témoins ou l'un des groupes de traitement, laissant moins de cinq concentrations d'essai non compromises, l'épreuve indépendante en cours s'arrête et l'origine de la mortalité ou de l'anomalie doit être identifiée. Les données des groupes compromis ne sont pas prises en considération pour l'analyse. Si les éleuthéroembryons doivent être anesthésiés pour l'imagerie, on ajoute 2 mL de méthanesulfonate de tricaine (MS-222) tamponné à 1 g/L dans les puits des plaques six puits. L'anesthésie est recommandée dans tous les cas où les éleuthéroembryons sont placés dans une goutte de liquide pour l'imagerie. Elle est uniquement déconseillée si l'acquisition des images a lieu pendant que ceux-ci se meuvent en nage libre, par exemple dans un puits d'une plaque 96 puits. Pour éviter toute anesthésie excessive, on n'anesthésie, à chaque série de lectures, que le nombre d'organismes nécessaire pour cette série. Après le début de l'anesthésie (1 à 5 min), si nécessaire, les éleuthéroembryons sont transférés sur le support qui sera utilisé pour l'imagerie, par exemple surface en plastique noir ou plaques noires 96 puits. On procède ensuite à l'imagerie en utilisant une caméra couleur et des filtres passe-haut GFP. Une image de la région dorsale incluant les reins de chaque organisme est acquise avec les paramètres définis pendant l'étalonnage.

### **Fin de l'expérience**

47. Après lecture de la fluorescence, chaque éleuthéroembryon est euthanasié par exposition à 1 g/L de MS-222 tamponné pendant au moins 20 minutes.

## Analyse des données / évaluation des résultats d'essai

### *Considérations relatives à l'analyse des données*

48. Les mesures de fluorescence provenant d'images d'éléuthéroembryons mal positionnés (voir Annexe 7) doivent être éliminées des données avant l'analyse. La mortalité combinée et/ou les malformations ainsi que les données invalides dues aux éléuthéroembryons mal positionnés ne doivent pas excéder 10 % pour chaque groupe de traitement dans chaque épreuve (voir §20).

Un logiciel approprié sera utilisé pour le traitement des images en couleur des éléuthéroembryons et l'extraction d'une valeur numérique de la fluorescence GFP. À cet effet, on pourra recourir au logiciel libre ImageJ ou à la version plus récente FIJI (Schindelin et al., 2012). Pour exclure l'autofluorescence (fluorescence non produite par la GFP) des images, il est recommandé de séparer chaque couche de couleur (rouge, vert, bleu) des images. La couche rouge peut ensuite être soustraite de la couche verte ou les valeurs de la couche rouge peuvent être doublées et soustraites de la couche verte. Un seuil d'intensité peut être appliqué à l'image obtenue en vue de réduire l'arrière-plan dû à la pigmentation endogène. La somme de la fluorescence de tous les pixels de l'image obtenue doit ensuite être quantifiée. Cette technique est un moyen efficace de restreindre la mesure à la GFP en excluant la fluorescence endogène (autofluorescence). En effet, la fluorescence liée à la GFP ne sera visible que dans la couche verte, mais la fluorescence jaune apparaîtra à la fois dans les couches verte et rouge. Selon le système d'imagerie, il peut être utile de doubler la couche rouge si une certaine fluorescence endogène subsiste une fois soustraite la couche rouge non doublée. D'autres techniques permettant de réduire l'incidence de la pigmentation endogène sur la quantification du signal GFP peuvent être appliquées en fonction du système d'imagerie et des filtres de fluorescence utilisés. Une fois qu'on aura démontré qu'un certain flux d'analyse d'images répond aux critères de validation pour un système d'imagerie de fluorescence donné, il conviendra de l'appliquer à toutes les expériences qui suivent (voir §20 et Annexe 3).

49. Les données des trois épreuves indépendantes sont réunies afin d'obtenir 54 à 60 valeurs de fluorescence pour chaque concentration d'essai ou témoin valide. Le nombre maximal de valeurs est 60, puisque 20 éléuthéroembryons sont utilisés par épreuve pour chaque condition d'essai ou témoin et que l'essai RADAR comporte trois épreuves. Le seuil inférieur de 54 valeurs est la limite correspondant à 10 % de mortalité et/ou de malformations par épreuve, soit 18 valeurs par épreuve.

50. La réalisation de trois épreuves indépendantes vise à accroître la robustesse de l'essai. Ces trois épreuves peuvent cependant donner des résultats différents. Si tel est le cas, l'essai est toujours considéré comme valide. Les résultats de chacune des trois épreuves indépendantes sont comparés entre eux uniquement si le produit chimique d'essai s'avère actif sur la base du regroupement de l'ensemble des données et que le profil de la courbe concentration-réponse est non monotone (voir §55).

51. Si un solvant est utilisé lors de l'essai, il convient d'évaluer ses effets éventuels. Pour cela, on compare les résultats correspondant au groupe témoin avec solvant à ceux du groupe témoin milieu d'essai. S'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le témoin milieu d'essai et le témoin solvant, les valeurs relatives à ces deux groupes seront réunies. Si une différence statistiquement significative est détectée entre le témoin milieu d'essai et le témoin solvant sur l'ensemble des valeurs des trois épreuves, l'étude est compromise. Il convient alors d'examiner individuellement chaque épreuve pour

déterminer si le solvant a un effet reproductible sur les trois épreuves. Si tel est le cas, l'étude est compromise et un nouvel essai RADAR devra être réalisé avec un nouveau lot de solvant ou un autre solvant. Il est également important de vérifier si le solvant choisi remplit tous les critères de validité (§20, §35). S'il existe des données historiques indiquant que le solvant sélectionné, à la concentration choisie, n'induit pas de différence statistiquement significative par rapport au témoin milieu d'essai, ce dernier peut ne pas s'avérer nécessaire.

### *Analyse statistique*

52. Des méthodes statistiques appropriées doivent être utilisées conformément au document 54 de l'OCDE sur les approches actuelles de l'analyse statistique des données d'écotoxicité et leur application (OCDE, 2006). En règle générale, les effets du produit chimique d'essai sur la fluorescence par rapport au témoin sont analysés au moyen d'un test d'hypothèse bilatéral pour  $p < 0.05$ .

53. L'approche statistique recommandée, évaluée lors de l'exercice de validation interlaboratoire, vise à déterminer si les données relatives à chaque groupe d'exposition sont distribuées normalement en effectuant un test de normalité de D'Agostino-Pearson, puis en réalisant soit une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'un test de Dunnett si les données sont distribuées normalement avec des variances égales, soit un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Dunn si les données ne suivent pas une distribution normale ou si l'hypothèse d'homogénéité des variances n'est pas vérifiée (voir Annexe 8 pour une description plus détaillée). Une autre solution consiste à effectuer une analyse de variance hiérarchique (ou ANOVA mixte) avec un terme d'effet aléatoire rendant compte de la variabilité introduite par les épreuves ou les puits en vue d'analyser ce type de données, à condition de consigner les informations relatives aux puits pendant l'expérience. Une analyse ultérieure, par exemple un test de Dunnett, peut être utilisée pour déterminer l'ampleur et la signification de la différence.

### *Diagramme de décision*

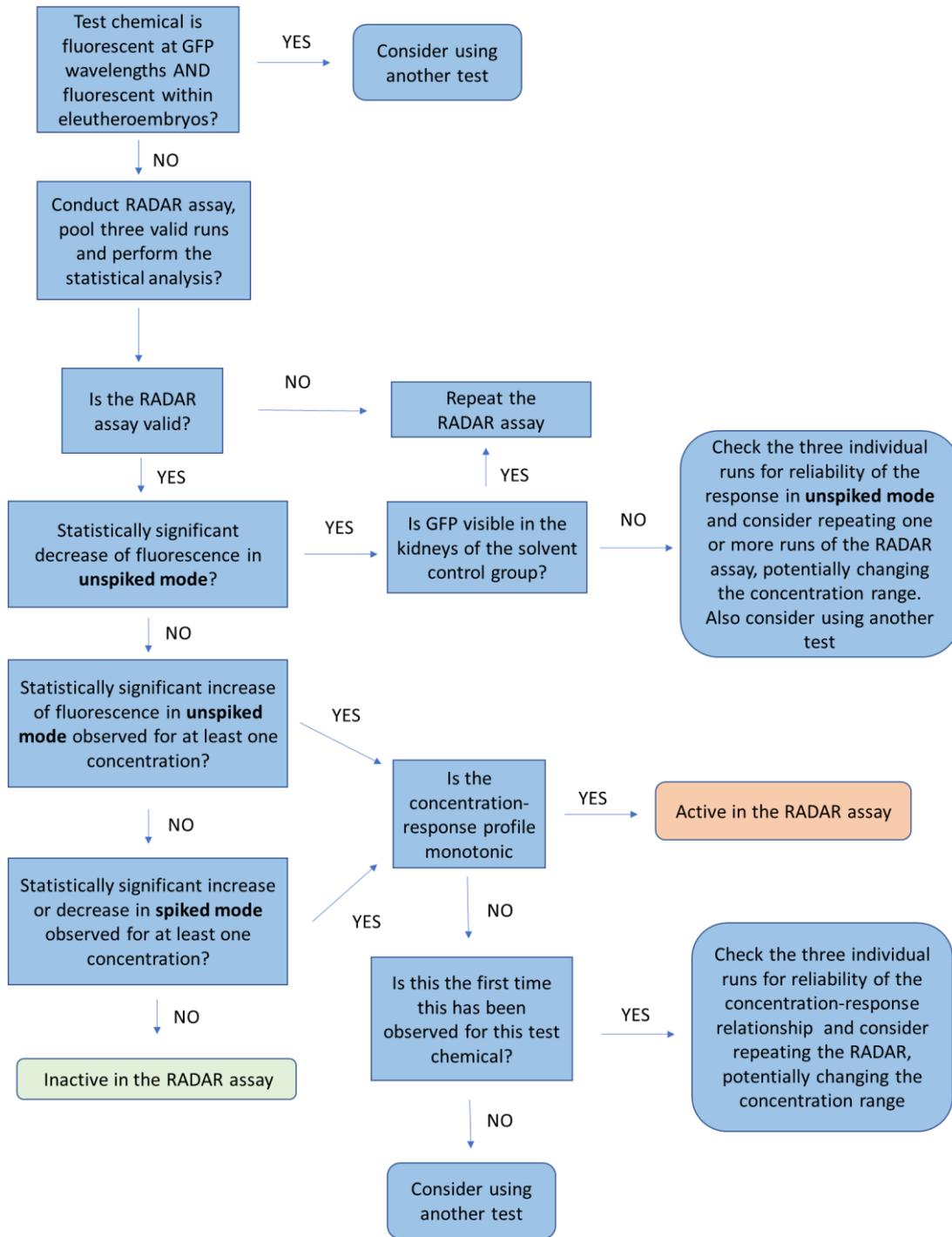
54. Un diagramme de décision a été élaboré pour l'essai RADAR afin d'apporter une aide à la conduite et à l'interprétation des résultats de l'essai (voir Graphique 2). Ce diagramme repose sur trois épreuves valides, dont les données sont réunies pour l'analyse statistique (voir Graphique 1 et §15). Un produit chimique est considéré comme donnant un résultat positif lors de l'essai RADAR si au moins une concentration d'essai est active en mode non enrichi ou enrichi en 17MT et qu'une relation concentration-réponse monotone est observée.

- En mode non enrichi, une concentration active est définie comme une concentration donnant une augmentation de fluorescence statistiquement significative par rapport au témoin solvant.
- En mode enrichi en 17MT, une concentration active est définie comme une concentration donnant une augmentation ou une diminution de fluorescence statistiquement significative par rapport au témoin 17MT 3 µg/L.

55. Si une relation concentration-réponse non monotone est observée, la fiabilité de ce résultat doit être confirmée en comparant les résultats des trois épreuves de l'essai RADAR. Si les résultats ne sont pas fiables, l'essai doit être répété, éventuellement avec une autre

plage de concentrations, en vue de confirmer le résultat (voir Graphique 2). Si le résultat est fiable, le produit chimique est considéré comme actif sur l'axe androgénique dans l'essai RADAR. Si l'on obtient les mêmes résultats lors de la répétition de l'essai, celui-ci n'est peut-être pas approprié pour le produit chimique concerné et le choix d'une autre méthode peut s'avérer nécessaire.

56. Aucune diminution de fluorescence n'est attendue en mode non enrichi, car les éléuthéroembryons ne synthétisent pas de niveaux détectables d'androgènes à ce stade de leur développement. Si une diminution de fluorescence statistiquement significative est observée en mode non enrichi, cela peut vouloir dire que l'essai RADAR n'est pas approprié pour ce produit chimique ou qu'un problème éventuel lié aux organismes ou aux conditions d'essai doit être recherché. Les trois épreuves seront examinées individuellement afin de déterminer si la diminution statistiquement significative de la fluorescence est présente dans chacune d'elle, et un avis d'expert sera nécessaire pour décider s'il faut ne répéter aucune épreuve, ou répéter une seule épreuve en utilisant un nouveau lot d'organismes, ou refaire l'essai complet en utilisant éventuellement une gamme de concentrations plus faibles, ou encore recourir à une autre méthode pour étudier l'activité sur l'axe androgénique.



**Graphique 2. Diagramme de décision pour l'interprétation des résultats de l'essai RADAR.**  
 Le document-guide 150 de l'OCDE fournit des indications complémentaires pour l'interprétation et l'extrapolation entre taxons des résultats de l'essai RADAR (OCDE, 2018). Dans le cas d'une diminution de fluorescence statistiquement significative en mode non enrichi, se référer au §56 pour de plus amples détails.

## RAPPORT D'ESSAI

57. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes.

### Produit chimique d'essai

- Substance monoconstituant : apparence physique, solubilité dans l'eau et autres propriétés physicochimiques pertinentes ; identification chimique, telle que désignation IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. (y compris teneur en carbone organique, si cela se justifie). De même, si ces informations sont disponibles : stabilité à la lumière, stabilité dans les conditions d'essai, pKa, Kow, informations sur le devenir du produit et son potentiel de dégradation rapide dans le système d'essai (p. ex. résultats d'un essai de biodégradabilité ; voir LD 301 (OCDE, 1992b) et LD 310 (OCDE, 2014a) de l'OCDE).
- Substance multiconstituant, UVCB et mélange : caractérisation de l'identité chimique dans la mesure du possible (voir ci-dessus), teneur et propriétés physicochimiques pertinentes des constituants.
- Méthode analytique de dosage du produit chimique d'essai et limite de quantification.
- Données disponibles ou résultats d'études préliminaires sur la stabilité ou la solubilité du produit chimique d'essai.
- Résultats relatifs à l'absence d'émission de fluorescence aux longueurs d'onde de 450 et 500 nm ( $\lambda_{EM} = 500\text{--}550$  nm) et à l'absence de fluorescence dans les éléuthéroembryons pour les substances dont la fluorescence est établie à ces longueurs d'onde.

### Espèce utilisée pour l'essai

- Nom scientifique, lignée transgénique, fournisseur ou provenance, conditions de culture.
- Pourcentage d'éléuthéroembryons morts et malformés éliminés du lot avant la réalisation de l'essai.

### Conditions de l'essai

- Mode opératoire (notamment concentrations d'essai, température, durée, conditions semi-statiques, volume, nombre d'organismes par mL).
- Caractéristiques du milieu d'essai : référence de l'eau minérale ou de l'eau de source, description du traitement de l'eau du robinet (p. ex. filtration sur charbon actif) ou milieu d'essai artificiel utilisé ainsi que toutes les mesures réalisées.
- Méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (indiquer le solvant utilisé et sa concentration, le cas échéant).

- Marque et références des plaques 6 puits utilisées pour l'exposition et de toutes les plaques utilisées pour la quantification de la fluorescence.
- Références et réglages du microscope à fluorescence utilisé pour la quantification. La méthode utilisée pour l'analyse des images doit également être indiquée.

## Résultats

- Résultats du ou des essais de détermination de la gamme de concentrations permettant de définir la CMT et/ou de choisir les concentrations pour l'essai définitif.
- Concentrations d'essai nominales et, si possible, résultats de toutes les analyses chimiques visant à déterminer la concentration du produit chimique dans les récipients d'essai ; concentration d'exposition mesurée sous la forme d'une moyenne statistique appropriée (moyenne arithmétique, moyenne pondérée dans le temps, etc.), s'il y a lieu ; on notera également dans le rapport le rendement de récupération de la méthode analytique et la limite de quantification.
- Nombres d'organismes morts ou malformés dans chaque épreuve ainsi que groupe(s) et jour(s) de survenue.
- Données brutes de quantification de la fluorescence (p. ex. données brutes individuelles). Dans l'idéal, les données seront collectées au format TAB ou CSV en indiquant les métadonnées suivantes dans le fichier : date, nom du produit chimique, concentration utilisée, solvant, nom de l'appareil et paramètres de collecte du signal, nom du laboratoire, numéro du lot d'éleuthéroembryons et valeurs de fluorescence.
- Approche utilisée pour l'analyse statistique et le traitement des données, y compris test statistique utilisé et raisons ayant conduit à éliminer certaines données, le cas échéant.
- Démonstration du respect de tous les critères de validité de la présente Ligne directrice.
- Présentation sous forme graphique et sous forme de tableau des moyennes de fluorescence de chaque groupe expérimental, incluant tous les témoins et toutes les concentrations de produit chimique d'essai (ainsi que l'erreur type de la moyenne), avec indication de la taille de l'échantillon.
- Pourcentage d'augmentation ou de diminution de la fluorescence pour chaque concentration par rapport à son témoin respectif en mode enrichi et non enrichi.
- S'il y a lieu et de manière facultative, résultats de l'évaluation des effets éventuels du solvant : comparaison statistique du groupe témoin solvant et du groupe témoin milieu d'essai, si inclus dans l'étude, ou résultat d'une étude antérieure.
- Autres effets biologiques observés ou mesurés : indiquer tout autre effet biologique observé ou mesuré (p. ex. comportement anormal, malformations ou pigmentation anormale).
- Explication de tout écart par rapport à la présente Ligne directrice ou aux critères de validité et considérations relatives aux conséquences possibles sur le résultat de l'essai.

- S'il y a lieu, discussion présentant les concentrations identifiées comme actives en mode enrichi et/ou non enrichi.
- Conclusion indiquant si le produit chimique d'essai est classé comme actif ou inactif sur l'axe androgénique à l'issue de l'essai RADAR.

## BIBLIOGRAPHIE

Borg, B., Antonopoulou, E., Andersson, E., Carlberg, T., Mayer, I. 1993. Effectiveness of several androgens in stimulating kidney hypertrophy, a secondary sexual character, in castrated male three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Can. J. Zool.* 7, 2327–2329.

Cui, J., Shen, X., Yan, Z., Zhao, H., and Nagahama, Y. (2009). Homology-modeled ligand-binding domains of medaka estrogen receptors and androgen receptors: a model system for the study of reproduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380, 115–121.

Hahlbeck, E., Katsiadaki, I., Mayer, I., Adolfsson-Erici, M., James, J., and Bengtsson, B.-E. (2004). The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption II--kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction. *Aquat. Toxicol.* 70, 311–326.

Horie, Y., Watanabe, H., Takanobu, H., Yagi, A., Yamagishi, T., Iguchi, T., and Tatarazako, N. (2017). Development of an *in vivo* anti-androgenic activity detection assay using fenitrothion in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *J. Appl. Toxicol.* 37, 339–346.

Hornung M.W., Cook P.M., Fitzsimmons P.N., Kuehl D.W., Nichols J.W. (2007). Tissue distribution and metabolism of benzo[a]pyrene in embryonic and larval medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicol. Sci.* 100, 393–405.

Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., and Pickford, D.B. (2006). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Aquat. Toxicol.* 76, 69–92.

Iwamatsu, T. (2004). Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* 121, 605–618.

Iwamatsu, T., Kobayashi, H., and Yamashita, M. (2006). Sex reversal in medaka treated *in vitro* with 17 $\alpha$ -methyl dihydrotestosterone during oocyte maturation. *Dev. Growth Differ.* 48, 59–64.

Jakobsson, S., Borg, B., Haux, C., and Hyllner, S. J. (1999). An 11-ketotestosterone induced kidney-secreted protein: the nest building glue from male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 79–85.

Jolly, C., Katsiadaki, I., Morris, S., Le Belle, N., Dufour, S., Mayer, I., Pottinger, T.G., and Scott, A.P. (2009). Detection of the anti-androgenic effect of endocrine disrupting environmental contaminants using *in vivo* and *in vitro* assays in the three-spined stickleback. *Aquat. Toxicol.* 92, 228–239.

Kashiwada S., Goka K., Shiraishi H., Arizono K., Ozato K., Wakamatsu Y., Hinton D.E. (2007). Age-dependent *in situ* hepatic and gill CYP1A activity in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 145, 96–102.

Katsiadaki, I., Morris, S., Squires, C., Hurst, M.R., James, J.D., and Scott, A.P. (2006). Use of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sensitive *in vivo* test for detection of environmental antiandrogens. *Environ. Health Perspect.* 114 Suppl 1, 115–121.

- Katsiadaki, I., Scott, A.P., Mayer, I. 2002a. Potential of the stickleback as a combined biomarker for estrogens and androgens in European waters. *Mar. Environ. Res.* 54, 725–728.
- Katsiadaki, I., Scott, A.P., Hurst, M.R., Matthiessen, P., Mayer, I. 200b. Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1946–1954.
- Kawahara, R., and Nishida, M. (2007). Extensive lineage-specific gene duplication and evolution of the spiggin multi-gene family in stickleback. *BMC Evol. Biol.* 7, 209.
- Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K., and Tanaka, M. (2009). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols* (John Wiley & Sons).
- Kiparissis, Y., Metcalfe, T.L., Balch, G.C., and Metcalfe, C.D. (2003). Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 63, 391–403.
- Kullman, S.W., and Hinton, D.E. (2001). Identification, characterization, and ontogeny of a second cytochrome P450 3A gene from the fresh water teleost medaka (*Oryzias latipes*). *Mol. Reprod. Dev.* 58, 149–158.
- Masuyama, H., Yamada, M., Kamei, Y., Fujiwara-Ishikawa, T., Todo, T., Nagahama, Y., and Matsuda, M. (2012). Dmrt1 mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by Dmy in the medaka. *Chromosome Res.* 20, 163–176.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., et al. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417, 559–563.
- Murata, K., Kinoshita, M., Naruse, K., Tanaka, M., and Kamei, Y. (2019). *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols* (John Wiley & Sons).
- Muschket, M., Di Paolo, C., Tindall, A.J., Touak, G., Phan, A., Krauss, M., Kirchner, K., Seiler, T.-B., Hollert, H., and Brack, W. (2018). Identification of unknown antiandrogenic compounds in surface waters by effect-directed analysis (EDA) using a parallel fractionation approach. *Environ. Sci. Technol.* 52, 288–297.
- Nakamura, A., Takanobu, H., Tamura, I., Yamamuro, M., Iguchi, T., and Tatarazako, N. (2014). Verification of responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to anti-androgens, vinclozolin and flutamide, in short-term assays. *J. Appl. Toxicol. JAT* 34, 545–553.
- OECD (1992), Test No. 301: Ready Biodegradability, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070349-en>.
- OECD (1998), Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070141-en>.
- OECD (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Series on Testing and Assessment No. 54, OECD, Paris.

OECD (2009), Test No. 230: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264076228-en>.

OECD (2010a). Validation Report of the 21-Day Androgenised Female Stickleback Screening Assay, Series on Testing and Assessment No. 128, OECD, Paris.

OECD (2011a). Guidance Document on the Androgenised Female Stickleback Screen, Series on Testing and Assessment No. 148, OECD, Paris.

OECD (2011b), Test No. 234: Fish Sexual Development Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264122369-en>.

OECD (2012), Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185265-en>.

OECD (2013), Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203785-en>.

OECD (2014a), Test No. 310: Ready Biodegradability - CO<sub>2</sub> in sealed vessels (Headspace Test), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264224506-en>.

OECD (2014b) Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Methods – Guidance used in Support of Pre and Post-Registration Data Requirements for Plant Protection and Biocidal Products, OECD Series on Testing and Assessment, No. 204, OECD Paris.

OECD (2015), Test No. 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264242258-en>.

OECD (2018), Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, No. 150, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>.

OECD (2019a), Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>.

OECD (2019b). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment, No. 23 (Second Edition), OECD Paris.

OECD (2022). Validation of the Rapid Androgen Disruption Activity Reporter (RADAR) assay for the detection of androgen active substances. OECD Series on Testing and Assessment, No. 353, OECD Paris.

Ogino, Y., Sébillot, A., Miyagawa, S., Tatarazako, N., and Iguchi, T. (2019) Screening and testing methods of endocrine-disrupting chemicals using medaka. In Murata, K., Kinoshita, M., Naruse, K., Tanaka, M., and Kamei, Y. eds. *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols* (John Wiley & Sons) pp. 275-280.

Orn, S., Yamani, S., and Norrgren, L. (2006). Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and 17 $\beta$ -trenbolone. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* *51*, 237–243.

Papoulias, D.M., Noltie, D.B., and Tillitt, D.E. (2000). Effects of methyl testosterone exposure on sexual differentiation in medaka, *Oryzias latipes*. *Mar. Environ. Res.* *50*, 181–184.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* *9*, 676–682.

Sébillot, A., Damdimopoulou, P., Ogino, Y., Spirhanzlova, P., Miyagawa, S., Du Pasquier, D., Mouatassim, N., Iguchi, T., Lemkine, G.F., Demeneix, B.A., and Tindall, A.J. (2014). Rapid fluorescent detection of (anti)androgens with spiggin-gfp medaka. *Environ. Sci. Technol.* *48*, 10919–10928.

Sohoni, P., Sumpter, J.P. (1998) Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J. Endocrinol.* *158*, 327-39.

Yamamoto, T. (1958). Artificial induction of functional sex-reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Zool.* *137*, 227–263.

Yamamoto, T.O. (1955). Progeny of artificially induced sex-reversals of male genotype (XY) in the medaka (*Oryzias latipes*) with special reference to YY-male. *Genetics* *40*, 406–419.

**ANNEXE 1. SIGLES, ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS**

**11-KT** : 11-kétotestostérone.

**17MT** : 17 $\alpha$ -méthyltestostérone.

**AR** : récepteurs des androgènes.

**BaP** : benzo(a)pyrène.

**CE<sub>x</sub>** : concentration produisant un effet à X % du niveau maximal, par exemple CE50 est la concentration induisant 50 % de l'effet maximal.

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

**CMT** : concentration maximale tolérée. La CMT est définie comme la concentration du produit chimique d'essai la plus élevée n'entraînant pas plus de 10 % de mortalité.

**CSEO** : la concentration sans effet observé est la concentration d'essai immédiatement inférieure à la CMEO.

**CYP** : cytochrome P450.

**DMSO** : diméthylsulfoxyde.

**Éleuthéroembryon** : le développement éleuthéroembryonnaire a lieu après l'éclosion, mais avant que l'embryon ne soit capable de se nourrir d'aliments exogènes ; c'est un stade au cours duquel le développement embryonnaire se poursuit. Si l'on applique cette définition à *O. latipes*, cette période du développement va du stade 39 (stade de l'éclosion) au stade 42 (formation des structures nécessaires à la capture des proies, dont les dents de la mâchoire supérieure, l'otolithe et la forme de toutes les nageoires) (Iwamatsu, 2004).

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

**ER** : récepteurs des œstrogènes.

**Essai RADAR** : essai de détection rapide d'un rapporteur de l'activité de perturbation androgénique (*Rapid androgen disruption activity reporter assay*).

**GFP** : protéine fluorescente verte.

**J** : jour après éclosion.

**JPF** : jour post-fécondation.

**mDHT** : 17 $\alpha$ -méthyl-5 $\alpha$ -dihydrotestostérone ou mestanolone.

**Milieu d'essai** : milieu utilisé pour l'essai ; il peut s'agir de toute eau permettant une croissance et un développement normaux chez *O. latipes*, notamment milieu médaka (voir Annexe 5), eau minérale plate dans une bouteille en verre, eau de source, eau de puits et eau du robinet filtrée sur charbon actif.

**Milieu médaka** : milieu artificiel spécifique pouvant être utilisé comme milieu d'essai (voir Annexe 5).

**Mode enrichi** : partie d'un essai RADAR réalisée en présence de 3  $\mu\text{g/L}$  de 17MT.

**Mode non enrichi** : partie d'un essai RADAR réalisée en l'absence de 17MT.

**MS-222** : méthanesulfonate de tricaïne.

**SMILES** : spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée.

***spg1-gfp*** : lignée transgénique de médaka porteuse d'une construction génétique composée de 4159 paires de bases du promoteur du gène *spiggin 1* de l'épinoche à trois épines en amont de la séquence codante de la GFP.

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

## ANNEXE 2. CONDITIONS DE L'ESSAI RADAR

Tableau 2. Synthèse des conditions de l'essai RADAR.

Organisme d'essai	Éleuthéroembryon <i>O. latipes spg1-gfp</i>	
Effet mesuré	Fluorescence de chaque éleuthéroembryon	
Période d'exposition	De J0 (début de l'essai) à J3 (fin de l'essai)	
Durée de l'exposition	72 h ± 2 h	
Régime d'exposition	Renouvellement après 24 h et 48 h. Pas d'alimentation.	
pH	6.5 à 8	
Conditions d'incubation pendant l'exposition	26 ± 1 °C, obscurité	
Organismes par concentration	5 organismes par puits (plaque 6 puits) x 4 puits (total de 20 organismes par concentration et par épreuve)	
Volume de milieu d'essai	8 mL par puits	
Milieu d'essai	Eau permettant une croissance et un développement normaux chez <i>O. latipes</i> (cf. §27).	
Nombre d'épreuves	Trois épreuves sont réalisées pour chaque produit chimique d'essai avec des solutions fraîchement préparées.	
Critères de sélection des individus inclus dans l'essai	Stade de développement (J0), santé des organismes (vivants et sans malformations).	
Critères de validité	<p>Pour chaque épreuve : mortalité combinée et/ou malformations ≤ 10 % dans tous les groupes témoins. Induction de fluorescence &gt; 300 % chez le témoin 17MT 10 µg/L par rapport au témoin solvant. Pour l'ensemble des trois épreuves réunies : induction de fluorescence &gt; 10 % chez le témoin 17MT 10 µg/L par rapport au témoin 17MT 3 µg/L et observation d'une relation concentration-réponse (voir §20).</p> <p>Au moins cinq concentrations d'essai non compromises. Aux fins de cet essai, une concentration d'essai est dite non compromise lorsqu'elle est considérée comme telle dans chacune des trois épreuves de l'essai. Une concentration d'essai (20 individus) est considérée comme non compromise dans une épreuve lorsque la mortalité combinée et les malformations sont ≤ 10 % dans le groupe.</p>	
Concentration du produit chimique d'essai	Si la concentration du produit chimique d'essai reste dans la limite de 20 % de la valeur nominale à tout moment, la concentration nominale est utilisée. À défaut, le résultat devra se fonder sur les concentrations déterminées. Par exemple, il est possible de calculer les moyennes géométriques de chaque ensemble de concentrations nouvelles/anciennes. La moyenne arithmétique de ces moyennes géométriques sera ensuite utilisée pour l'interprétation des données.	
Témoins	Témoin milieu d'essai et/ou solvant	Milieu d'essai et/ou milieu d'essai + solvant
	17α-méthyltestostérone (17MT)	17MT (3, 10 µg/L)
	17MT + flutamide	17MT (3 µg/L) + flutamide (500 µg/L)

## ANNEXE 3. ÉTALONNAGE : RÉGLAGE OPTIMAL DES PARAMÈTRES D'IMAGERIE

L'étalonnage a pour objet de faire en sorte que tous les laboratoires parviennent à des résultats comparables en matière d'amplitude de réponse et de sensibilité aux produits de référence 17MT et flutamide, et ce, même s'ils n'ont pas recours au même matériel d'imagerie pour la lecture de l'expérience. L'étalonnage comporte deux étapes.

- 1) Détermination des paramètres d'imagerie optimaux pour l'obtention d'une amplitude satisfaisante d'induction de la GFP avec une concentration de 17MT de 50 µg/L.
- 2) Application de ces paramètres à l'analyse quantitative lors de trois épreuves d'une expérience de concentration-réponse avec 17MT et flutamide afin de vérifier l'amplitude de l'induction à des concentrations croissantes de 17MT et de flutamide et de déterminer la concentration la plus faible de 17MT et de flutamide produisant une réponse GFP détectable.

L'exemple de protocole, décrit ci-dessous en deux étapes, implique l'utilisation de DMSO à 0.2% dans toutes les solutions d'exposition. Cette situation reflète un exemple, la même procédure peut être réalisée à l'aide d'un autre solvant. La procédure de calibration ne demande pas à être refaite si le solvant est changé lors de la mise en œuvre de l'essai RADAR, ou si l'essai est effectué pour la première fois sans solvant.

### 1- Sélection des paramètres d'acquisition d'images

La première étape consiste à déterminer les bons paramètres d'acquisition d'images pour l'expérience d'étalonnage. Une fois définis, ces paramètres seront utilisés pour les expériences à venir. Pour choisir les paramètres d'acquisition d'images, on expose 50 éléuthéroembryons à 50 µg/L de 17MT et on ajuste les paramètres comme indiqué dans le protocole suivant. Une seule épreuve est requise pour cette étape.

- Préparation du milieu d'exposition
  - Le groupe témoin se compose de 10 puits, contenant chacun 5 éléuthéroembryons de la lignée *spg1-gfp*.
  - La concentration finale de DMSO s'élève à 0.2 % dans tous les puits.
  - Préparer une solution de 50 mg/L de 17MT dans du DMSO.
    - Préparer des aliquotes de 200 µL de la solution de 50 mg/L de 17MT.
    - Conserver les aliquotes à -20 °C pendant 2 mois au maximum.
  - Préparer la solution d'exposition suivante de 50 µg/L de 17MT contenant 0.2 % de DMSO.

Milieu d'essai	100 mL
17MT à 50 mg/L dans DMSO	100 µL
DMSO	100 µL

- Début de l'exposition
  - Ajouter 5 éléuthéroembryons transgéniques *spg1-gfp* dans chaque puits.

- Retirer le plus possible de liquide sans dessécher les éléuthéroembryons (volume maximal restant : 800 µL).
- Remplir chaque puits avec 8 mL de la solution d'exposition.
- Incuber les plaques à 26 °C dans l'obscurité. Ne pas nourrir les éléuthéroembryons pendant l'expérience.
- Renouvellement du milieu à 24 h et 48 h
  - Noter la mortalité et éliminer tout éléuthéroembryon mort.
  - Préparer les solutions d'exposition conformément aux indications du tableau.
  - Retirer le plus possible de liquide.
  - Remplir les puits avec 8 mL de leur milieu respectif.
  - Incuber les plaques à 26 °C dans l'obscurité. Ne pas nourrir les éléuthéroembryons pendant l'expérience.
- Rinçage des éléuthéroembryons à 72 h
  - Préparer des plaques 6 puits pour le rinçage, contenant 8 mL d'eau permettant une croissance et un développement normaux chez *O. latipes* (cf. §27) dans chaque puits.
  - Transférer tous les éléuthéroembryons d'un groupe d'exposition de leur plaque de traitement à la plaque de rinçage.
- Lecture de la fluorescence des éléuthéroembryons à 72 h
  - Si nécessaire, anesthésier les éléuthéroembryons exposés à 50 µg/L de 17MT en plaçant 2 mL de MS-222 à 1 g/L dans chaque puits des plaques 6 puits. Veiller à anesthésier une seule plaque à la fois.
  - Placer les éléuthéroembryons de façon à permettre une imagerie de la face dorsale par le système.
  - Ajuster l'objectif et la mise au point du microscope à fluorescence afin de déterminer la distance focale maximale permettant une imagerie des deux reins.
  - Vérifier les autres éléuthéroembryons sur la plaque pour s'assurer que les deux reins sont visibles sur la même image avec la focale sélectionnée. Si ce n'est pas le cas, réajuster l'objectif et réitérer le processus.
  - Si possible, réinitialiser la balance des blancs de la caméra.
  - Régler le gain de la caméra sur zéro et ajuster le temps d'exposition jusqu'à ce que les reins soient aussi lumineux que possible sans apparaître blancs.
  - S'il faut régler l'exposition à plus de 100 ms pour obtenir la saturation du signal GFP (zones blanches dans le signal GFP), augmenter le gain et recommencer.
  - Vérifier les autres éléuthéroembryons sur la plaque pour s'assurer que le temps d'exposition choisi ne rend pas blanche une partie importante des reins. Le cas échéant, ajuster le temps d'exposition et réitérer le processus.
  - Enregistrer et consigner les paramètres sélectionnés pour la caméra et conserver le fichier des paramètres pour le rappeler à chaque future session d'imagerie.
  - Acquérir une image de chaque éléuthéroembryon.
  - Une fois toutes les images prises, euthanasier les éléuthéroembryons.
  - Analyser les images en suivant les instructions figurant du §48 au §53.
  - Des exemples d'images d'éléuthéroembryons après exposition à un androgène (vue dorsale) sont présentés ci-après (Annexe 7).

## 2- Détermination de la linéarité et de la sensibilité à la 17MT et au flutamide

La seconde étape consiste à déterminer la linéarité et la sensibilité à la 17MT et au flutamide. Pour mener à bien cette étape, des groupes de 20 éléuthéroembryons sont exposés à une série de concentrations de 17MT et à une série de concentrations de flutamide en présence de 3 µg/L de 17MT. Trois épreuves indépendantes sont requises pour cette étape.

- Préparation du milieu d'exposition
  - Chaque groupe témoin se compose de 4 puits, contenant chacun 5 éléuthéroembryons de la lignée *spg1-gfp*.
  - La concentration finale de DMSO s'élève à 0.2 % dans tous les puits.
  - Préparer une solution de 10 mg/L de 17MT dans du DMSO.
    - Préparer des aliquotes de 200 µL de la solution de 10 mg/L de 17MT.
    - Conserver les aliquotes à -20 °C pendant 2 mois au maximum.
  - Préparer une solution de 500 mg/L de flutamide dans du DMSO.
    - Préparer des aliquotes de 200 µL de la solution de 500 mg/L de flutamide.
    - Conserver les aliquotes à -20 °C pendant 2 mois au maximum.
  - Préparer les solutions d'essai conformément au Tableau 3.

Les groupes d'essai sont les suivants.

Témoin solvant : milieu d'essai ; 0.2 % de DMSO  
17MT 1.5 µg/L ; 0.2 % de DMSO  
17MT 3 µg/L ; 0.2 % de DMSO  
17MT 10 µg/L ; 0.2 % de DMSO  
Flutamide 18.5 µg/L + 17MT 3 µg/L ; 0.2 % de DMSO  
Flutamide 55.6 µg/L + 17MT 3 µg/L ; 0.2 % de DMSO  
Flutamide 167 µg/L + 17MT 3 µg/L ; 0.2 % de DMSO  
Flutamide 500 µg/L + 17MT 3 µg/L ; 0.2 % de DMSO

Tableau 3. Préparation des solutions d'essai et solutions intermédiaires (cases grisées).

Nom de la solution	Concentration finale ( $\mu\text{g/L}$ )	Volume intermédiaire à préparer (mL)	Solutions à mélanger	Volume final (mL)
Milieu médaka ; 0.1 % de DMSO		300	300 mL de milieu médaka + 300 $\mu\text{L}$ de DMSO	20
Témoin solvant		70	70 mL de milieu médaka ; 0.1 % de DMSO + 70 $\mu\text{L}$ de DMSO	45
17MT 10 ; 0.1 % de DMSO		175	175 mL de milieu médaka + 175 $\mu\text{L}$ de 17MT 10 mg/L	35
17MT 3 ; 0.1 % de DMSO		300	90 mL de 17MT 10 ; 0.1 % de DMSO + 210 mL de milieu médaka ; 0.1 % de DMSO	10
17MT 10	10	50	50 mL de 17MT 10 ; 0.1 % de DMSO + 50 $\mu\text{L}$ de DMSO	50
17MT 3	3	220	220 mL de 17MT 3 ; 0.1 % de DMSO + 220 $\mu\text{L}$ de DMSO	45
17MT 1.5	1.5	50	25 mL de 17MT 3 + 25 mL de témoin solvant	50
Flutamide 500	500	70	70 mL de 17MT 3 ; 0.1 % de DMSO + 70 $\mu\text{L}$ de flutamide 500 mg/L	45
Flutamide 167	167	75	25 mL de flutamide 500 + 50 mL de 17MT 3	50
Flutamide 55.6	55.6	75	25 mL de flutamide 167 + 50 mL de 17MT 3	50
Flutamide 18.5	18.5	75	25 mL de flutamide 55.6 + 50 mL de 17MT 3	75

- Début de l'exposition
  - Ajouter 5 éléuthéroembryons transgéniques *spg1-gfp* dans chaque puits.
  - Retirer le plus possible de liquide sans dessécher les éléuthéroembryons (volume maximal restant : 800  $\mu\text{L}$ ).
  - Procéder au traitement du témoin solvant, puis des groupes 17MT et enfin des groupes 17MT + flutamide.
  - Remplir chaque puits avec 8 mL de chaque préparation.
  - Incuber les plaques à 26 °C dans l'obscurité. Ne pas nourrir les éléuthéroembryons pendant l'expérience.

- Renouvellement du milieu à 24 h et 48 h
  - Noter la mortalité et éliminer tout éléuthéroembryon mort.
  - Préparer les solutions d'exposition conformément au Tableau 3.
  - Retirer le plus possible de liquide à l'aide d'une pipette de transfert souple.
  - Remplir les puits avec 8 mL de leur milieu respectif.
  - Incuber les plaques à 26 °C dans l'obscurité. Ne pas nourrir les éléuthéroembryons pendant l'expérience.
  
- Rinçage des éléuthéroembryons à 72 h
  - Préparer des plaques 6 puits pour le rinçage, contenant 8 mL d'eau déchlorée ou d'eau minérale dans chaque puits.
  - Transférer tous les éléuthéroembryons d'un groupe d'exposition de leur plaque de traitement à la plaque de rinçage.
  - Transporter les plaques de rinçage dans la salle où aura lieu la lecture.
  
- Lecture de la fluorescence des éléuthéroembryons à 72 h
  - Charger les paramètres d'acquisition d'images enregistrés à la fin de la première étape de l'expérience d'étalonnage.
  - Si nécessaire, anesthésier les éléuthéroembryons exposés au témoin solvant en plaçant 2 mL de MS-222 à 1 g/L dans chaque puits des plaques 6 puits. Veiller à anesthésier une seule plaque à la fois.
  - Après le début de l'anesthésie (1 à 5 min), si nécessaire, transférer les éléuthéroembryons sur le support qui sera utilisé pour l'imagerie, par exemple surface en plastique noir ou plaques noires 96 puits à fond transparent.
  - Placer les éléuthéroembryons de façon à permettre une imagerie de la face dorsale par le système.
  - Acquérir une image de chaque éléuthéroembryon.
  - Une fois toutes les images prises pour un groupe d'exposition, euthanasier les éléuthéroembryons.
  - Procéder ainsi pour la lecture pour tous les groupes.
  - Analyser les images en suivant les instructions figurant du §48 au §53.
  
- Interprétation des résultats
  - Après analyse statistique et représentation graphique de l'ensemble des données réunies, noter la CMEO pour la 17MT et le flutamide.
  - La CMEO doit être d'au moins 3 µg/L pour la 17MT et d'au moins 500 µg/L pour le flutamide.
  - Les deux produits doivent présenter une relation concentration-réponse sur toute la gamme des concentrations d'essai.
  - Si cette relation n'est pas apparente en raison soit d'une faible sensibilité à des concentrations peu élevées soit d'une saturation du signal à des concentrations élevées, on s'efforcera d'ajuster les paramètres d'acquisition d'images pour améliorer la relation concentration-réponse.

## ANNEXE 4. RÉCEPTION DES EMBRYONS : ACCLIMATATION ET ACCEPTATION DES LOTS

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

Consignes relatives aux embryons reçus trois jours avant le début de l'essai RADAR

- Ne pas mélanger des embryons fécondés à des jours différents.
- Trier les embryons pour éliminer les embryons morts ou anormaux, qui doivent représenter moins de 20 % du lot ; à défaut, le lot ne sera pas utilisé pour l'essai RADAR.
- Transférer uniquement les embryons vivants et normaux dans un cristalliseur 1.4 L ou une boîte de Petri 15 cm contenant une eau adaptée à l'élevage d'embryons de médaka (voir Annexe 5).
- La densité maximale est de 500 embryons par cristalliseur et de 200 embryons par boîte de Petri.
- Incuber les embryons avec éclairage à 26 °C environ, selon un cycle de 14 heures de lumière et de 10 heures d'obscurité. Ajuster la température si nécessaire de sorte que l'éclosion des embryons ait lieu vers le 9<sup>e</sup> ou 10<sup>e</sup> jour post-fécondation (JPF) (tolérance : JPF 7-12). Les éleuthéroembryons doivent être à J0, mais le nombre de jours post-fécondation (JPF) peut varier. Cependant, cette différence ne doit pas dépasser un JPF pour une même épreuve. Les différents groupes d'exposition doivent être constitués d'éleuthéroembryons sélectionnés de manière aléatoire.
- Renouveler le milieu d'élevage des embryons au moins une fois au cours de la période de développement embryonnaire menant à l'éclosion.

## ANNEXE 5. QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU ACCEPTABLE POUR L'ÉLEVAGE D'EMBRYONS DE MÉDAKA

**Tableau 4. Caractéristiques d'une eau convenant à l'élevage d'embryons de médaka jusqu'à l'éclosion.**

Caractéristique	Plage recommandée	Tolérance
Déchloration	-	Essentielle
Filtration des particules	25 µm	Recommandée
Filtration sur charbon actif	-	Recommandée
Conductivité	230-290 microsiemens	
Température	26 °C	26-30 °C
Bleu de méthylène	1 mL de solution à 1 g/L par L	Recommandée
pH	7.2-8.2	Essentielle

Si un milieu artificiel est utilisé, une autre option ayant fait l'objet de nombreux essais, y compris lors de l'exercice de validation interlaboratoire de l'OCDE, est décrite ci-après.

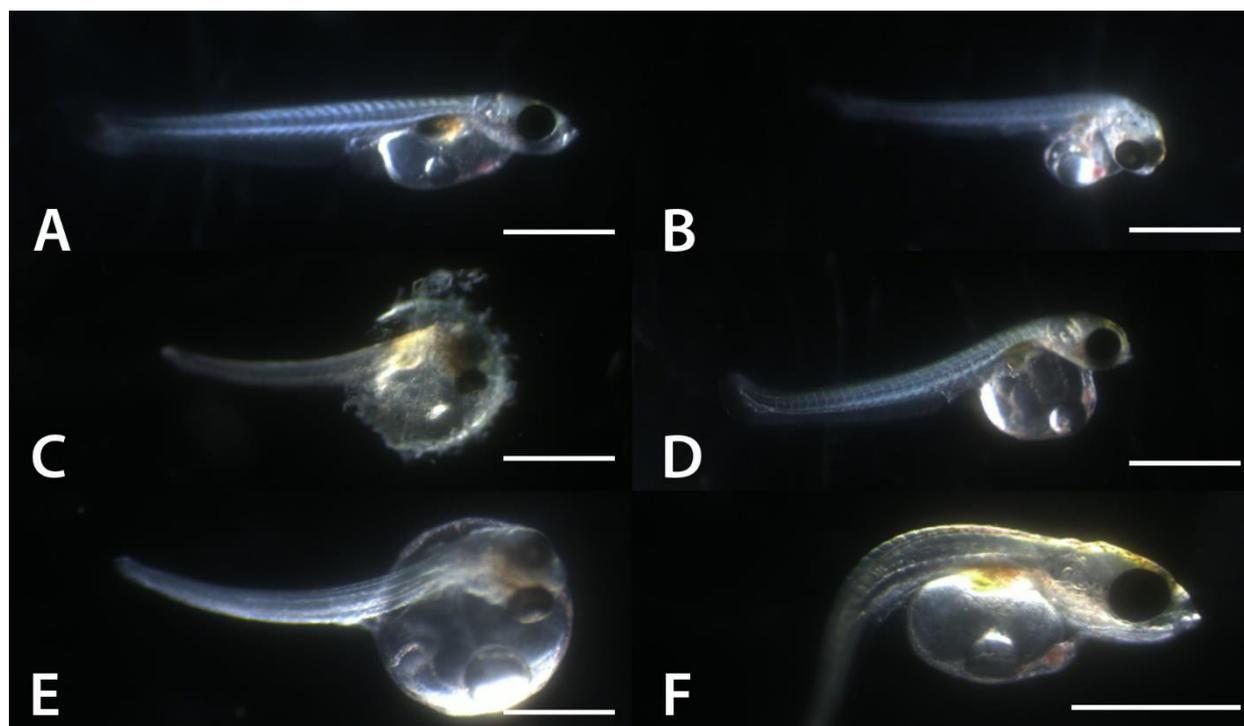
Une solution mère de milieu médaka 10X présente la composition suivante :

- NaCl            5 g/L
- CaCl<sub>2</sub>        0.151 g/L
- MgSO<sub>4</sub> 0.098 g/L
- KCl            0.15 g/L
- NaOH 1N      1.25 mL/L

Cette solution est ensuite diluée dix fois dans de l'eau d'osmose inverse afin d'obtenir la solution de travail 1X. Ajuster le pH avec une solution de NaOH 1N pour que sa valeur soit comprise entre 7.2 et 8.0.

Outre les milieux artificiels, il est également possible d'élever les embryons de médaka dans de l'eau minérale plate dans une bouteille en verre, de l'eau de source, de l'eau de puits, de l'eau du robinet filtrée sur charbon actif ou dans tout autre milieu favorisant une croissance et un développement normaux chez *O. latipes*.

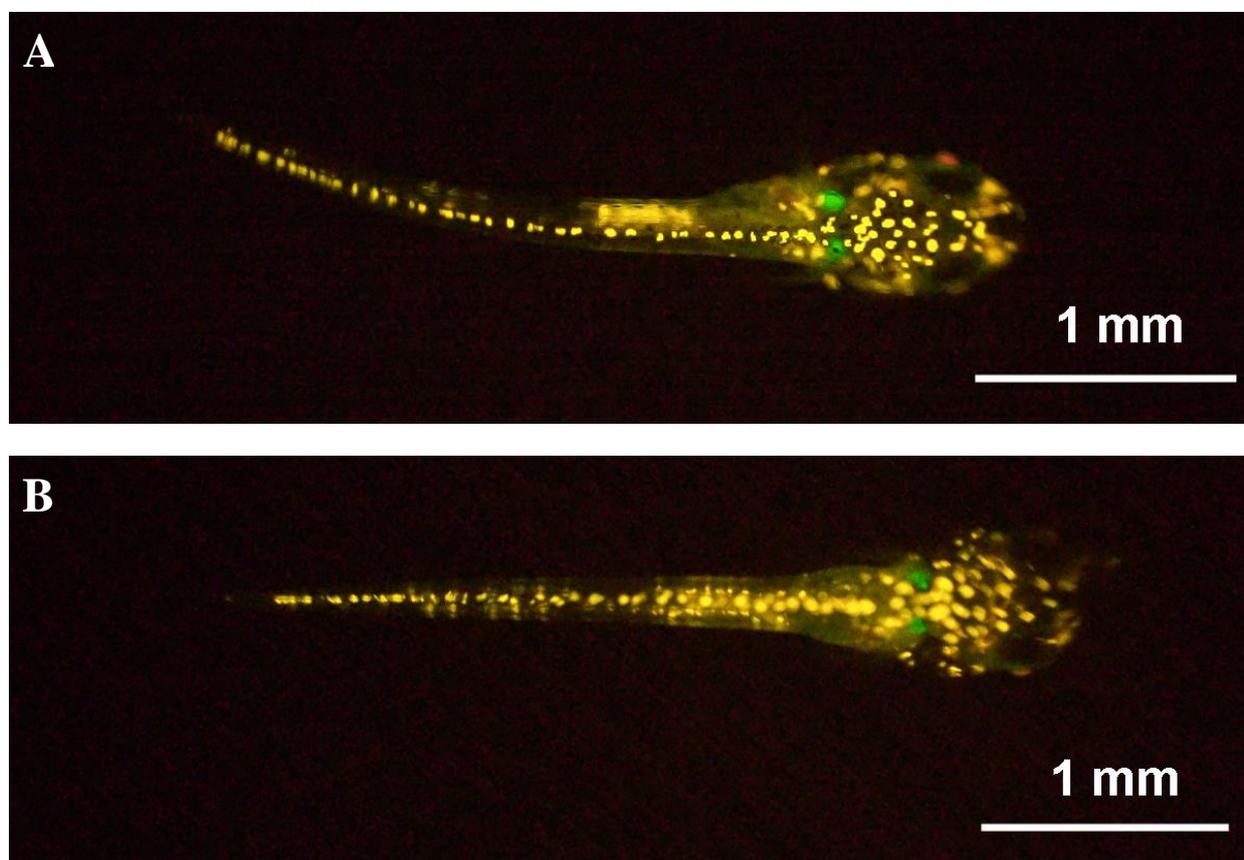
ANNEXE 6. CLICHÉS PHOTOGRAPHIQUES D'AIDE À  
L'IDENTIFICATION DES ÉLEUTHÉROEMBRYONS NORMAUX ET  
ANORMAUX



**Graphique 3. Clichés photographiques d'aide à l'identification des éleuthéroembryons normaux et anormaux. (A) Éleuthéroembryon normal. Éleuthéroembryons anormaux : (B) petit, cet éleuthéroembryon est clairement moins long que les autres du même lot ; (C) partiellement éclos, l'éleuthéroembryon n'est pas encore complètement sorti de son œuf ; (D et E) sous-développés, tous deux ont un sac vitellin très grand pour un médaka éclos, présentant encore une forme sphérique ; (F) malformé, la queue est incurvée vers le bas. Les barres d'échelle représentent 1 mm.**

## ANNEXE 7. POSITIONNEMENT DES ÉLEUTHÉROEMBRYONS

Le Graphique 4 ci-dessous illustre la façon dont les éléuthéroembryons doivent être positionnés pour l'imagerie. Le positionnement des éléuthéroembryons est considéré comme correct s'il permet une imagerie de la région dorsale incluant la zone où se trouvent les reins.



Graphique 4. A et B) Vues dorsales de deux éléuthéroembryons de médaka *spg1-gfp* présentant un signal GFP dans les reins. Les éléuthéroembryons font face à la droite de l'image.

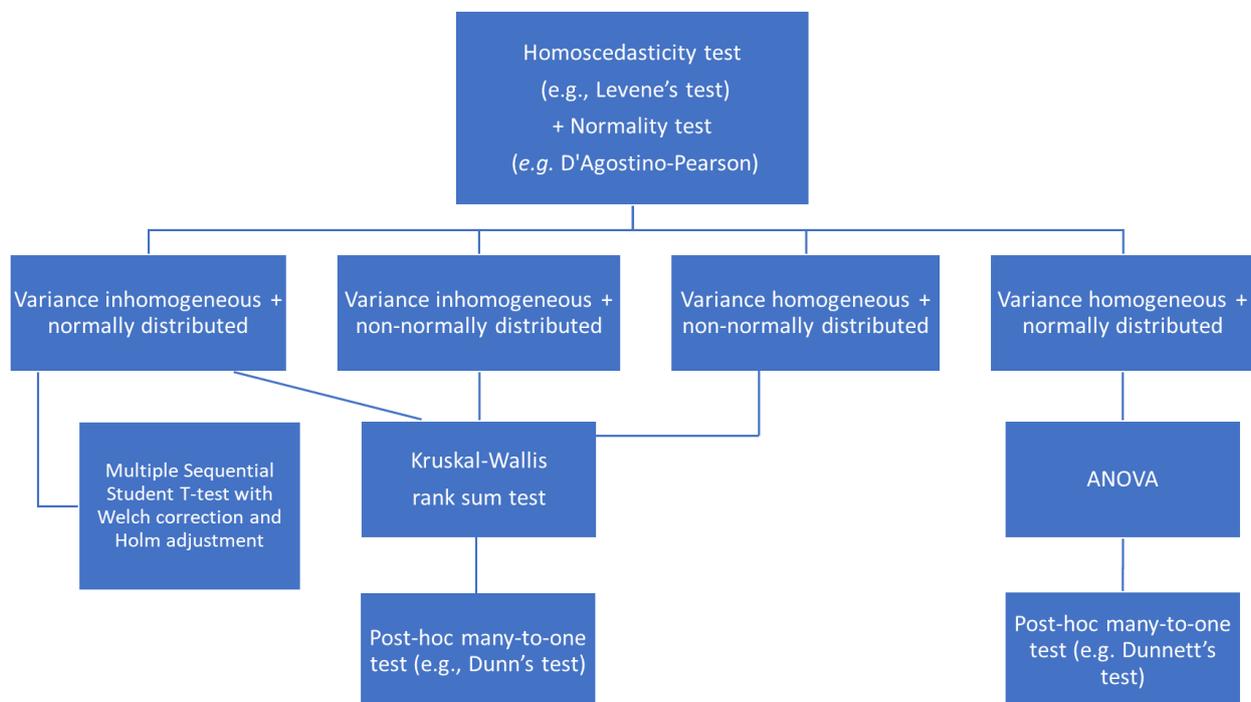
## ANNEXE 8. MÉTHODES D'ANALYSE STATISTIQUE DES DONNÉES DE L'ESSAI RADAR

L'approche statistique recommandée, évaluée lors de l'exercice de validation interlaboratoire, vise d'abord à déterminer si les données relatives à chaque groupe d'exposition sont distribuées normalement en effectuant un test de normalité de D'Agostino-Pearson. Pour savoir si la variance est homogène, on procède à un test d'homoscédasticité (p. ex. test de Levene).

Si les données sont distribuées normalement et que l'hypothèse d'homogénéité des variances est vérifiée, on réalise une analyse de la variance (ANOVA) pour les groupes de produits chimiques d'essai sans ajouts dosés (mode non enrichi) et le témoin négatif (témoin solvant ou témoin milieu d'essai selon le cas), suivie d'un test de Dunnett. De même, une ANOVA doit être réalisée pour les groupes de produits chimiques d'essai avec ajouts dosés (mode enrichi) et le témoin 17MT 3 µg/L, suivie d'un test de Dunnett.

Si les données suivent une distribution normale, mais que l'hypothèse d'homogénéité des variances n'est pas vérifiée, on procède à un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunn ou de Welch.

Si les données ne suivent pas une distribution normale, on effectue un test de Kruskal-Wallis pour les groupes de produits chimiques d'essai sans ajouts dosés (mode non enrichi) et le témoin négatif (témoin solvant ou témoin milieu d'essai selon le cas), suivi d'un test de Dunn. De même, un test de Kruskal-Wallis doit être réalisé pour les groupes de produits chimiques d'essai avec ajouts dosés (mode enrichi) et le témoin 17MT 3 µg/L, suivi d'un test de Dunn.



**Graphique 5. Flux d'analyse statistique recommandé pour la comparaison de plus de deux groupes dans l'essai RADAR.**

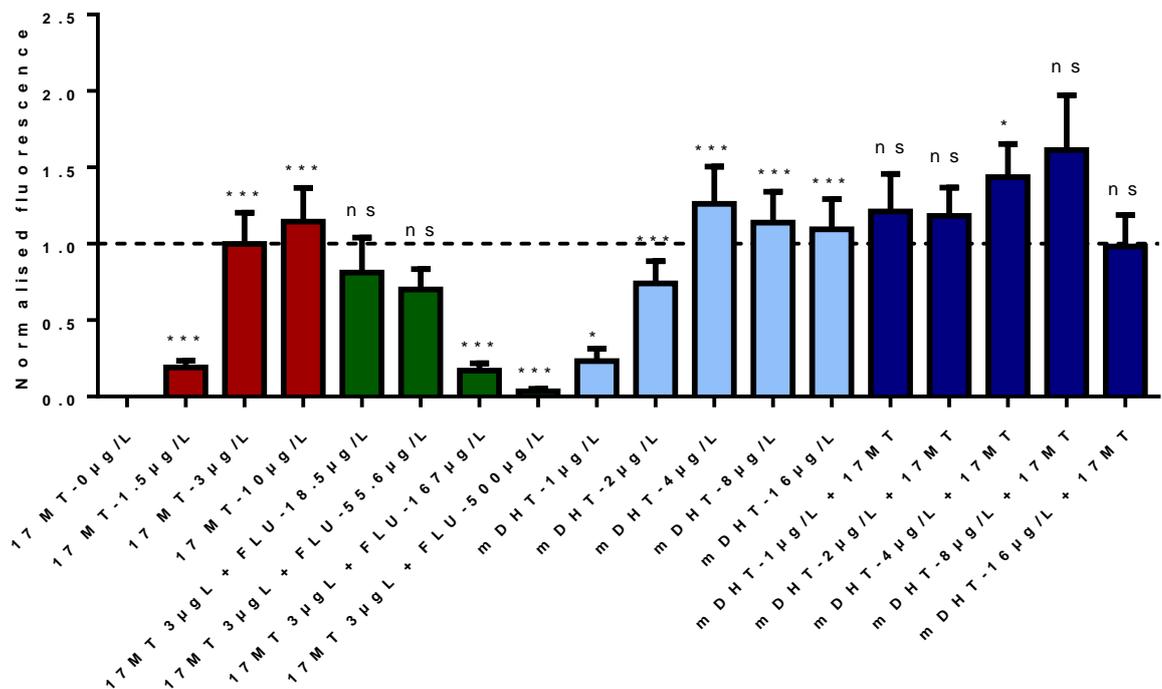
Une autre solution consiste à effectuer une analyse de variance hiérarchique (ou ANOVA mixte) avec un terme d'effet aléatoire rendant compte de la variabilité introduite par les épreuves ou les puits en vue d'analyser ce type de données, à condition de consigner les informations relatives aux puits pendant l'expérience. Une analyse ultérieure, par exemple un test de Dunnett, peut être utilisée pour déterminer l'ampleur et la signification de la différence.

Si l'on ne compare que deux groupes, par exemple le témoin 17MT 3 µg/L et le témoin 17MT 3 µg/L + flutamide 500 µg/L, il convient de commencer par déterminer si les données relatives à chaque groupe d'exposition sont distribuées normalement en effectuant un test de normalité de D'Agostino-Pearson. Si c'est le cas, on procède à un test T de Student avec correction de Welch. Si les données de l'un des deux groupes ou des deux ne suivent pas une distribution normale, il faut réaliser un test de Mann-Whitney.

## ANNEXE 9. COURBES CONCENTRATION-RÉPONSE TYPIQUES ET LEUR INTERPRÉTATION

Pour faciliter l'interprétation de l'essai RADAR, des histogrammes illustrant les résultats obtenus au cours de l'étude de validation de l'OCDE pour les quatre produits chimiques d'épreuve de compétence figurent ci-dessous à titre d'exemples. L'interprétation de chaque résultat est présentée succinctement. On notera que, lors de l'étude de validation, tous les laboratoires ont utilisé l'intégralité des témoins, y compris les témoins optionnels.

### mDHT



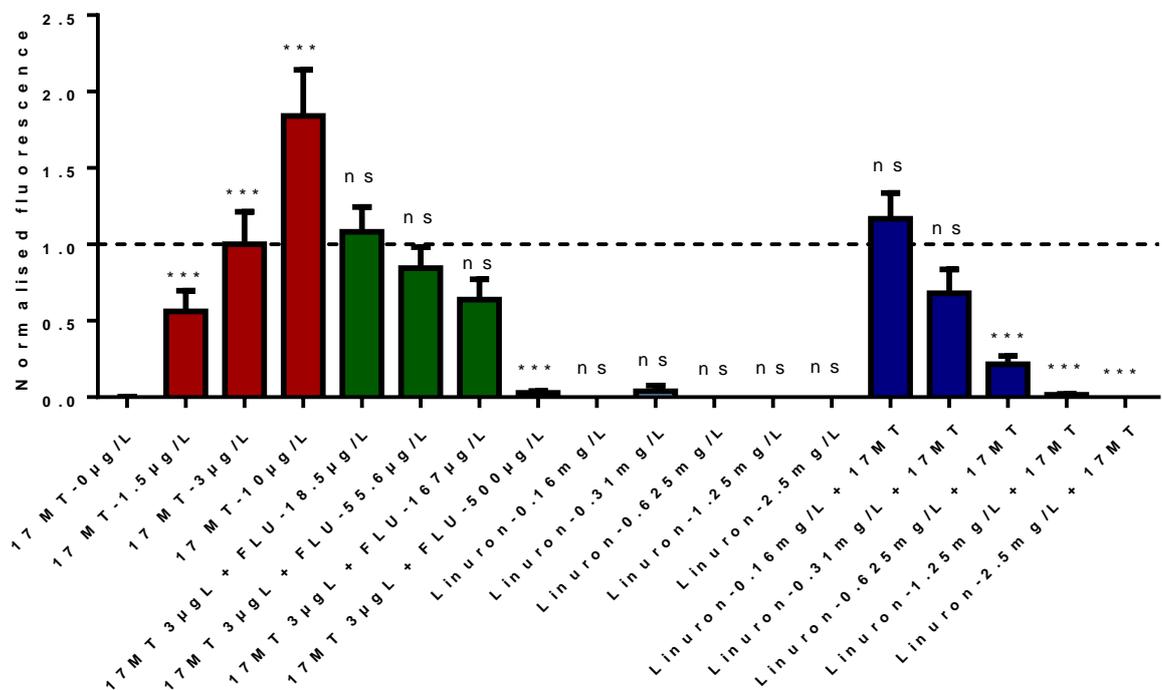
**Graphique 6. Exemple de résultat obtenu avec la mDHT lors de l'étude de validation de l'OCDE. La fluorescence a été normalisée à la valeur de fluorescence moyenne du témoin 17MT 3 µg/L. La signification statistique est représentée par \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$  ; ns (non significatif) :  $p > 0.05$ .**

Les épreuves individuelles avaient déjà rempli les critères de validité. Le graphique 6 montre que tous les critères de validité applicables aux témoins dans l'ensemble des données réunies ont été remplis par le laboratoire réalisant cet essai RADAR. La

fluorescence moyenne normalisée du groupe témoin 17MT 10 µg/L est supérieure de plus de 10 % à celle du groupe 17MT 3 µg/L (14 % plus élevée). La fluorescence moyenne normalisée du groupe 17MT 3 µg/L + flutamide 500 µg/L présente une différence statistiquement significative par rapport à celle du groupe 17MT 3 µg/L ( $p < 0.001$ ).

La fluorescence moyenne normalisée d'au moins une concentration de mDHT en mode non enrichi (barres bleu clair) présente une différence statistiquement significative par rapport au groupe 17MT 0 µg/L (témoin solvant) et une relation concentration-réponse monotone est observée. On en conclut donc que la mDHT est active dans l'essai RADAR.

## Linuron



**Graphique 7. Exemple de résultat obtenu avec le linuron lors de l'étude de validation de l'OCDE. La fluorescence a été normalisée à la valeur de fluorescence moyenne du témoin 17MT 3 µg/L. La signification statistique est représentée par \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$  ; ns (non significatif) :  $p > 0.05$ .**

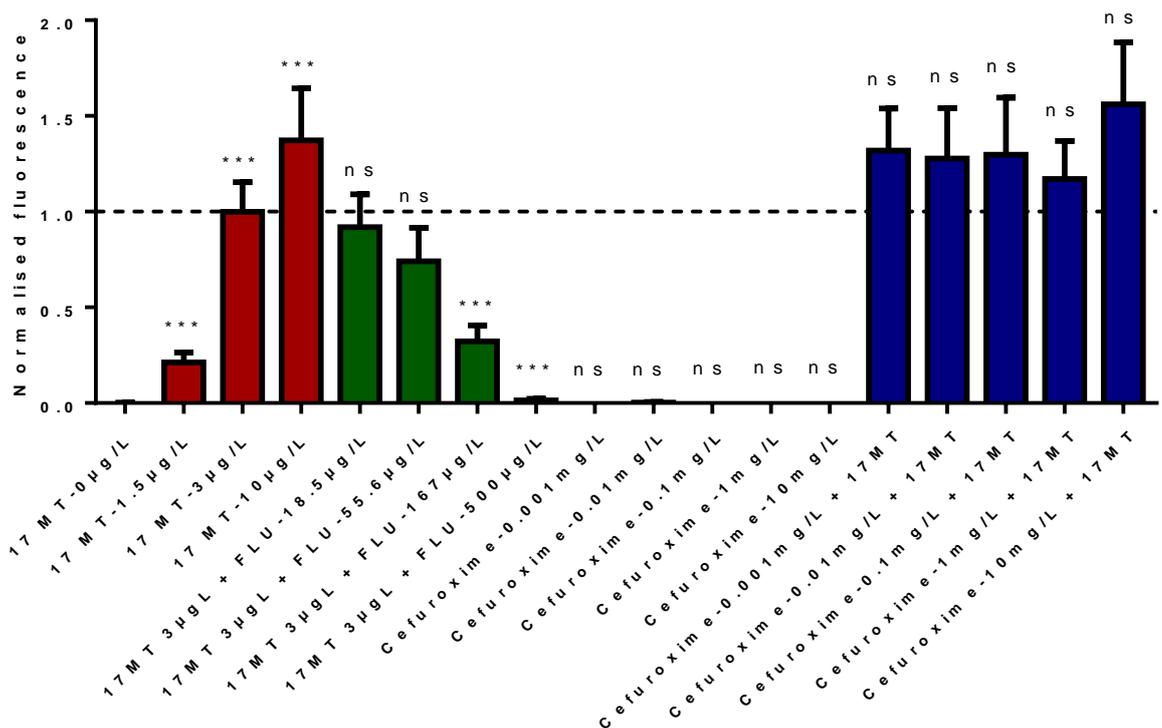
Les épreuves individuelles avaient déjà rempli les critères de validité. Le graphique 7 montre que tous les critères de validité applicables aux témoins dans l'ensemble des données réunies ont été remplis par le laboratoire réalisant cet essai RADAR. La

fluorescence moyenne normalisée du groupe témoin 17MT 10 µg/L est supérieure de plus de 10 % à celle du groupe 17MT 3 µg/L (84 % plus élevée). La fluorescence moyenne normalisée du groupe 17MT 3 µg/L + flutamide 500 µg/L présente une différence statistiquement significative par rapport à celle du groupe 17MT 3 µg/L ( $p < 0.001$ ).

Aucune des concentrations d'essai de linuron ne fait ressortir de différence statistiquement significative de la fluorescence moyenne normalisée en mode non enrichi (barres bleu clair) par comparaison avec le groupe 17MT 0 µg/L (témoin solvant).

La fluorescence moyenne normalisée d'au moins une concentration de linuron en mode enrichi (barres bleu foncé) présente une différence statistiquement significative par rapport au groupe 17MT 3 µg/L (témoin avec ajouts dosés) et une relation concentration-réponse monotone est observée. On en conclut donc que le linuron est actif dans l'essai RADAR.

Céfuroxime



Graphique 8. Exemple de résultat obtenu avec le céfuroxime lors de l'étude de validation de l'OCDE. La fluorescence a été normalisée à la valeur de fluorescence moyenne du témoin

**17MT 3 µg/L. La signification statistique est représentée par \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ;  
\*\*\* :  $p < 0.001$  ; ns (non significatif) :  $p > 0.05$ .**

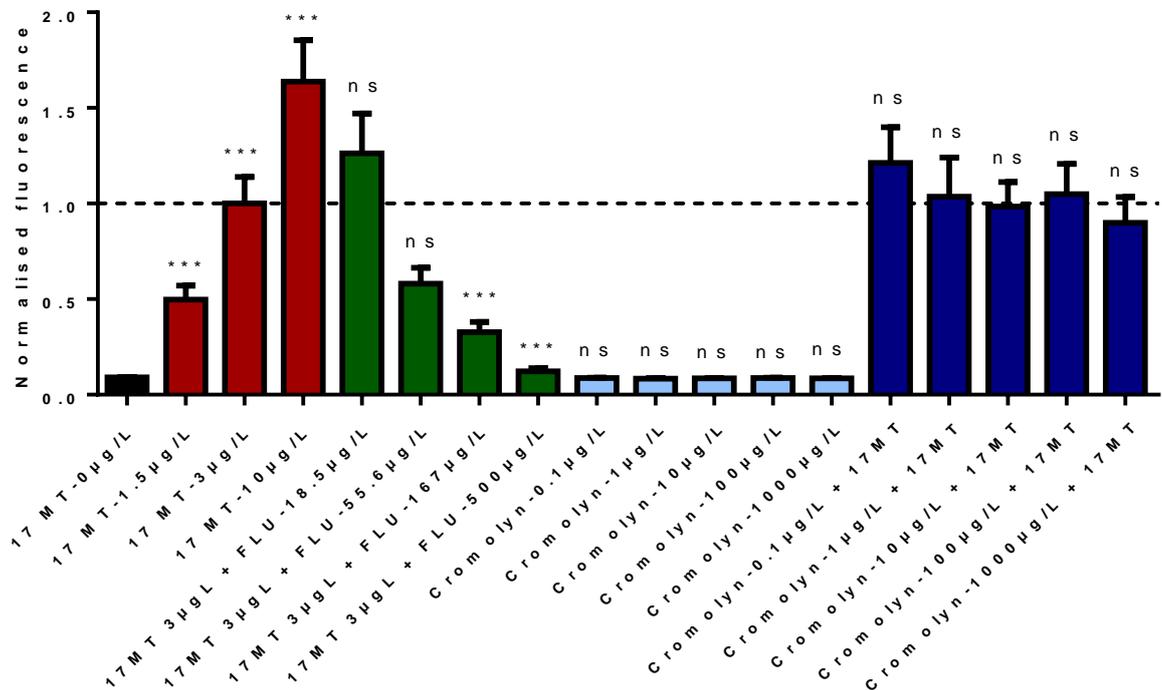
Les épreuves individuelles avaient déjà rempli les critères de validité. Le graphique 8 montre que tous les critères de validité applicables aux témoins dans l'ensemble des données réunies ont été remplis par le laboratoire réalisant cet essai RADAR. La fluorescence moyenne normalisée du groupe témoin 17MT 10 µg/L est supérieure de plus de 10 % à celle du groupe 17MT 3 µg/L (37 % plus élevée). La fluorescence moyenne normalisée du groupe 17MT 3 µg/L + flutamide 500 µg/L présente une différence statistiquement significative par rapport à celle du groupe 17MT 3 µg/L ( $p < 0.001$ ).

Aucune des concentrations d'essai de céfuroxime ne fait ressortir de différence statistiquement significative de la fluorescence moyenne normalisée en mode non enrichi (barres bleu clair) par comparaison avec le groupe 17MT 0 µg/L (témoin solvant).

Aucune des concentrations d'essai de céfuroxime ne met en évidence de différence statistiquement significative de la fluorescence moyenne normalisée en mode enrichi (barres bleu foncé) par rapport au groupe 17MT 3 µg/L (témoin avec ajouts dosés).

On en conclut donc que le céfuroxime est inactif dans l'essai RADAR.

## Cromolyn



**Graphique 9. Exemple de résultat obtenu avec le cromolyn lors de l'étude de validation de l'OCDE. La fluorescence a été normalisée à la valeur de fluorescence moyenne du témoin 17MT 3 µg/L. La signification statistique est représentée par \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$  ; ns (non significatif) :  $p > 0.05$ .**

Les épreuves individuelles avaient déjà rempli les critères de validité. Le graphique 9 montre que tous les critères de validité applicables aux témoins dans l'ensemble des données réunies ont été remplis par le laboratoire réalisant cet essai RADAR. La fluorescence moyenne normalisée du groupe témoin 17MT 10 µg/L est supérieure de plus de 10 % à celle du groupe 17MT 3 µg/L (64 % plus élevée). La fluorescence moyenne normalisée du groupe 17MT 3 µg/L + flutamide 500 µg/L présente une différence statistiquement significative par rapport à celle du groupe 17MT 3 µg/L ( $p < 0.001$ ).

Aucune des concentrations d'essai de cromolyn ne fait ressortir de différence statistiquement significative de la fluorescence moyenne normalisée en mode non enrichi (barres bleu clair) par comparaison avec le groupe 17MT 0 µg/L (témoin solvant).

Aucune des concentrations d'essai de cromolyn ne met en évidence de différence statistiquement significative de la fluorescence moyenne normalisée en mode enrichi (barres bleu foncé) par rapport au groupe 17MT 3 µg/L (témoin avec ajouts dosés).

On en conclut donc que le cromolyn est inactif dans l'essai RADAR.

**ANNEXE 10. DISPONIBILITÉ DE LA LIGNÉE *SPG1-GFP***

Concernant la lignée de médaka transgénique *spg1-gfp*, l'accès est assuré dans les pays membres de l'OCDE et aux pays adhérents à l'Acceptation Mutuelle des données à travers WatchFrog, ainsi que les laboratoires partenaires. Il est envisagé que ces laboratoires partenaires formeront un réseau de distribution, comprenant notamment les laboratoires ayant pris part à l'essai circulaire de validation, ainsi que des collections telles que TEFOR (France), the project national de bioressources (Japon), IDEA Consulting (Japon), le Muséum National d'Histoire Naturelle (France), tel que pour l'essai XETA (OCDE LD 248). Un réseau similaire que pour l'essai XETA (OCDE LD 248) d'organismes de recherche contractuels auront la possibilité de distribuer le test RADAR de façon indépendante du développeur de la méthode (ibacon GmbH, Eurofins, Charles River et Scymaris).

L'accès à la lignée cellulaire exige un accord de licence. Le développeur de la méthode a déjà signé un document juridique s'engageant à se conformer aux principes de l'OCDE Fair, Reasonable And Non-Discriminatory (FRAND) pour la mise à disposition de cet essai. Une approche similaire a déjà été mise en œuvre avec succès pour l'essai XETA (LD 248) et un certain nombre d'autres essais in vitro.

La création de cet accord de licence garantira que la lignée cellulaire est celle qui a été validée en permettant à un fournisseur légitime d'être identifié.