



Section 2
Effets sur les systèmes biologiques

Essai n° 252:
Essai rapide d'activité estrogen *in vivo*
(REACTIV, Rapid Estrogen ACTivity *In Vivo*)

25 juin 2024

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



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

Essai REACTIV (Rapid Estrogen ACTivity In Vivo)

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice relative à l'essai REACTIV (*Rapid Estrogen ACTivity In Vivo*) décrit un essai aquatique faisant appel à des éléuthéroembryons d'*Oryzias latipes* (médaka japonais) transgénique au jour zéro après éclosion (JAE0 ; voir Annexe 1 pour les abréviations et définitions), dans un format multipuits, afin d'identifier les produits chimiques agissant sur l'axe œstrogénique. La méthode REACTIV a été conçue comme un outil de dépistage assurant un débit moyen pour des essais à court terme visant à mesurer la réponse d'éléuthéroembryons à des produits chimiques potentiellement actifs sur l'axe œstrogénique (1). Les modes d'action attestés comme étant couverts par l'essai sont décrits ci-dessous (voir §10). L'essai REACTIV a pour vocation de permettre une classification des produits chimiques en produits potentiellement actifs ou inactifs sur l'axe œstrogénique, mais n'est pas conçu pour permettre la détermination de valeurs toxicologiques (CSEO ou CEx). L'essai REACTIV sera placé au niveau 3 du cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais des perturbateurs endocriniens (2).
2. L'espèce sélectionnée pour l'essai REACTIV est le poisson médaka japonais, *Oryzias latipes* (*O. latipes*). 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 ; (3), LD 210 (essai de toxicité aux premiers stades de la vie chez le poisson ; (4), LD 212 (essai de toxicité à court terme chez le poisson aux stades de l'embryon et de l'alevin ; (5), LD 229 (essai à court terme de reproduction des poissons ; (6)), LD 230 (essai de 21 jours sur les poissons ; (7), LD 234 (essai de développement sexuel des poissons ; (8), LD 240 (étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez médaka ; (9), LD 251 (essai de détection rapide d'un rapporteur de l'activité de perturbation androgénique ; (10) et le Document Guide de l'OCDE No. 379 sur un Essai de screening anti-androgenic sur medaka juvenile (JAMASA) (11).
3. L'essai REACTIV repose sur la transcription et utilise une lignée transgénique de médaka porteuse de la construction génétique *chgh-gfp*. La lignée transgénique *chgh-gfp* utilisée dans l'essai REACTIV est porteuse de 2.047 kb du promoteur du gène choriogénine H du médaka, immédiatement en amont du codon d'initiation induisant l'expression de la séquence codante de la protéine fluorescente verte (GFP, *Green Fluorescent Protein*). L'expression du transgène *chgh-gfp* s'observe dans le

foie du médaka en réponse à l'activation de la signalisation de l'axe œstrogénique. On observe également une expression ectopique non inductible de la GFP dans certaines cellules du cœur et de la tête aux stades éléuthéroembryonnaires. Cela fournit une confirmation visuelle du fait que les alevins en cours de développement sont transgéniques.

4. Il a été constaté que la région promotrice présente dans le transgène contient des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE, *Estrogen Response Elements*) putatifs et que l'expression du transgène est considérablement modulée en présence d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs des œstrogènes (ER, *Estrogen Receptors*) ainsi que de composés induisant ou inhibant les enzymes stéroïdogéniques (12)(13)(1).
5. Les gènes de la choriogénine, comme la vitellogénine, sont nécessaires à la production des œufs chez les poissons. Leur expression est stimulée par la signalisation de l'axe œstrogénique. À l'étape terminale de la signalisation de l'axe œstrogénique, l'expression des gènes de la choriogénine et de la GFP dans la lignée de médaka *chgh-gfp* représente les effets globaux ou nets des facteurs tant endogènes qu'exogènes modifiant la signalisation de l'axe œstrogénique (changements dans la production, le transport, le métabolisme et l'excrétion des hormones ainsi que dans l'activation et l'inhibition des ER).
6. Avant de pratiquer l'essai REACTIV, le laboratoire vérifiera qu'il dispose des certifications éventuellement requises par la réglementation locale sur l'utilisation d'organismes transgéniques. L'essai REACTIV doit être réalisé uniquement sur la lignée transgénique *chgh-gfp* utilisée pour l'élaboration de la présente Ligne directrice, qui est disponible dans le commerce (OCDE, Rapport de validation de l'essai REACTIV). L'utilisation d'une autre lignée transgénique basée sur le promoteur du gène choriogénine H induisant l'expression de la GFP ou d'un autre gène rapporteur suppose une validation complète par l'OCDE afin d'adapter les critères de validation, l'analyse statistique et les seuils de fluorescence ainsi que 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 REACTIV.
7. La présente proposition de ligne directrice repose sur une étude de validation interlaboratoire internationale conduite entre 2020 et 2022 (14). L'essai a été validé dans six laboratoires, avec 18 substances d'essai monoconstituants, dont 4 ont été soumises à l'essai dans six laboratoires, 6 autres dans cinq laboratoires, 2 autres dans quatre laboratoires, 1 autre dans trois laboratoires, 4 autres dans deux laboratoires et 1 autre dans un laboratoire.
8. L'effet mesuré est la fluorescence dans le foie des éléuthéroembryons. On observe un très faible niveau de fluorescence dans le foie des éléuthéroembryons non exposés. 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. Le niveau de fluorescence des éléuthéroembryons exposés au produit chimique d'essai est comparé à celui des éléuthéroembryons non exposés au produit chimique d'essai.
9. Le produit chimique est mis à l'essai en présence et en l'absence de 30 µg/L de testostérone (T). Les niveaux d'œstrogènes et d'androgènes circulants demeurant très faibles au stade éléuthéroembryonnaire. Par conséquent, la T circulant sera

principalement d'origine exogène et non endogène. Alors l'oestradiol endogène et la T sont très faibles à ce stade, la CYP19 (aromatase) est quand même exprimée et les éléuthéroembryons sont compétents pour convertir la T exogène en oestradiol. L'ajout de T au milieu d'essai permet la détection de substances affectant la disponibilité de la T ou antagonistes des ER, dans la mesure où la T est métabolisée *in vivo* dans l'oestradiol par l'enzyme cytochrome P450 ou aromatase (CYP19). La concentration de T utilisée pour le cotraitement a été déterminée de manière empirique. La concentration choisie (30 µg/L) est la concentration d'essai la plus basse de T induisant une augmentation de fluorescence statistiquement significative suite à une exposition de 24 h. Le changement induit dans l'expression du gène par la combinaison de T et du produit chimique d'essai est donc un phénomène obtenu en laboratoire, non observé en l'absence de T exogène à ce stade de développement. Par conséquent, il indique uniquement la capacité du produit soumis à l'essai à induire une activité (anti)œstrogénique et n'est pas à ce jour considéré comme prédisant un résultat physiologique. Cependant, cela permet l'identification de mécanismes d'action qui ne seraient pas décelés en l'absence d'un androgène aromatisable, par exemple les modifications de l'activité de l'aromatase ou l'antagonisme des ER.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

10. L'essai mesure la capacité d'un produit chimique à activer ou à inhiber la transcription de la construction génétique *chgh-gfp*, soit directement par l'établissement d'une liaison avec les ER ou la modification de la liaison entre œstrogènes et ER, soit indirectement en modifiant la quantité d'œstrogènes disponibles pour activer les ER et donc la transcription de la construction *chgh-gfp*. À ce jour, on a pu constater que l'essai REACTIV détecte les produits chimiques agissant par différents mécanismes d'action, notamment les suivants : agonistes des ER (p. ex. œstradiol, œstrone) ; modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (SERM, *Selective Estrogen Receptor Modulators*) (p. ex. tamoxifène) ; modulateurs de la stéroïdogénèse, y compris inhibiteurs de l'aromatase (p. ex. anastrozole et fadrozole), inhibiteurs de la transcription de l'aromatase (p. ex. prochloraze) et inducteurs de la transcription de l'aromatase (p. ex. œstrogènes) et produits chimiques nécessitant une activation métabolique (p. ex. T) (OCDE, Rapport de validation de l'essai REACTIV) (1). En outre, l'essai REACTIV permet potentiellement d'identifier les modulateurs du transport des œstrogènes par le biais de leur interaction avec les protéines de liaison plasmatiques. L'essai REACTIV ne permet pas de distinguer les différents mécanismes d'action, mais indique si un produit chimique joue globalement le rôle d'activateur ou d'inhibiteur de l'axe œstrogénique chez les éléuthéroembryons *O. latipes*.
11. La transcription de la construction *chgh-gfp* nécessitant l'action directe des ER sur le promoteur choriogénine H, l'essai REACTIV n'est pas conçu pour détecter les produits chimiques affectant la signalisation des ER lorsque celle-ci passe par d'autres voies de signalisation ne conduisant pas à une modification de l'interaction

- entre les ER et l'ADN (« actions non génomiques »). Cela inclut la signalisation rapide des œstrogènes par le biais des ER localisés sur les membranes. L'importance relative de la signalisation des ER non génomique est très mal comprise à l'heure actuelle.
12. 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. Le foie se forme entre le jour après fertilisation (JAF) 2 et 4, environ 7 jours avant l'éclosion et le début de l'essai REACTIV (Iwamatsu, 2004). Il a été constaté que l'embryon de médaka était capable, avant la formation du foie au jour 1 après fertilisation (JAF1), de transformer le benzo(a)pyrène (BaP) en métabolites, y compris le BaP-3-glucuronide, montrant l'action de l'UDP-glucuronosyltransférase (15). Une forte activité du cytochrome P450 (CYP) 1A a également été identifiée dans le foie, les branchies et d'autres organes du médaka à JAE1 (16). Par ailleurs, l'expression du CYP3A40 s'observe tout au long du développement du médaka et celle du CYP3A38 (forme post-embryonnaire) dès JAE1 (17). En exposant le médaka à de l'imidaclopride avant éclosion, on a pu détecter des métabolites hydroxyle et oléfine à l'éclosion, ce qui indique une activité du cytochrome CYP3A4 (18)(19)(20). En outre, on a également détecté de l'imidaclopride-urée, ce qui suggère une activité des cytochromes CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 et/ou CYP2E1. L'expression des enzymes stéroïdogéniques P450 aromatasase, 11 β -hydroxylase et 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase a quant à elle été détectée avant éclosion (21). De fait, il a été proposé d'utiliser le médaka avant éclosion comme modèle pour étudier le métabolisme des stéroïdes anabolisants, et il a été montré qu'il produit certains métabolites lorsqu'il est exposé à de la méthandrosténolone, notamment trois métabolites monohydroxylés et un métabolite réduit qui sont produits par l'humain (22).
 13. 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 qui émettent une fluorescence comprise 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 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 œstrogénique. Un protocole simple permettant de déterminer si le produit chimique d'essai émet une fluorescence est proposé au §31. Ce protocole requiert l'utilisation d'éléuthéroembryons *O. latipes* de type sauvage.
 14. L'essai REACTIV ne doit pas être utilisé pour la mise à l'essai de produits chimiques ne relevant pas de son domaine d'applicabilité. Il est adapté à la mise à l'essai de substances non volatiles. 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, de caractériser la

composition du produit en question en déterminant, par exemple, l'identité chimique de ses constituants, leur teneur et leurs propriétés spécifiques. On trouvera des recommandations pour la mise à l'essai des produits chimiques difficiles à tester (tels que les mélanges, UVCB ou substances multiconstituants) dans le Document-guide de l'OCDE n° 23 (23).

PRINCIPE DE L'ESSAI

Plan expérimental général

15. Le plan expérimental général consiste à exposer à un produit chimique d'essai des éléuthéroembryons de médaka transgénique *chgh-gfp* à JAE0 dans des plaques six puits en présence (mode enrichi [avec ajouts dosés]) et en l'absence (mode non enrichi [sans ajouts dosés]) d'un cotraitement avec 30 µg/L de T. Il conviendra de réaliser trois épreuves indépendantes pour chaque essai. Pour chaque épreuve, il est recommandé d'utiliser au moins cinq concentrations ainsi que les témoins obligatoires (un témoin milieu d'essai et/ou témoin solvant, un témoin 17α-éthinyloestradiol [EE2] à 488 ng/L, un témoin T, un témoin induction pour les groupes avec ajouts dosés [mode enrichi] et un témoin inhibition pour les groupes avec ajouts dosés [mode enrichi]). L'essai nécessite huit éléuthéroembryons répartis dans un seul puits par condition d'essai (concentrations d'essai et témoins, sauf le témoin T qui implique deux puits de huit éléuthéroembryons), en régime statique. 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. Il faudra néanmoins veiller à éviter toute contamination croisée. Comme chacune des trois épreuves comprend cinq concentrations d'essai et les témoins obligatoires, l'essai REACTIV nécessitera 128 éléuthéroembryons par épreuve (136 si le groupe témoin milieu d'essai et le groupe témoin solvant sont tous deux requis) ; il faudra donc 384 éléuthéroembryons pour l'ensemble des trois épreuves constituant un essai (voir Graphique 1 et §17) (408 si le groupe témoin milieu d'essai et le groupe témoin solvant sont tous deux requis). La durée de l'exposition est de 24 h avec un cycle de 14 heures de lumière et de 10 heures d'obscurité. L'essai mesure la fluorescence de la GFP chez les éléuthéroembryons transgéniques *chgh-gfp* par imagerie de fluorescence, qui transforme le signal de fluorescence en donnée numérique. On trouvera à l'Annexe 2 une présentation détaillée des conditions d'essai.

Témoins

16. L'essai REACTIV requiert les groupes témoins obligatoires suivants, qui auront tous la même concentration de solvant organique (si l'on en utilise un), sauf le témoin milieu d'essai. Dans la même logique, tous les groupes exposés au produit chimique

d'essai doivent être exposés à la même concentration de solvant que les groupes témoins.

- a. Témoin milieu d'essai et/ou témoin solvant : 1 puits avec 8 organismes par puits est exposé 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 les cas où un solvant est utilisé en l'absence de données historiques, il est nécessaire d'utiliser à la fois un groupe témoin milieu d'essai et un groupe témoin solvant .
- b. Témoin EE2 488 ng/L : 1 puits avec 8 organismes par puits est exposé à 488 ng/L d'EE2. Ce témoin permet de déterminer un niveau quasi maximal de fluorescence observable pour la plupart des mécanismes d'action. La valeur utilisée correspond en outre à la plus basse concentration d'EE2 ayant induit une réduction statistiquement significative de la fécondité dans le cadre d'un essai de 21 jours sur les médakas (24).
- c. Témoin T 30 µg/L : 2 puits avec 8 organismes par puits sont exposés à 30 µg/L de T. Ce témoin sert à induire la signalisation de l'axe œstrogénique par le biais de la conversion endogène du T en œstradiol. L'induction de la signalisation de l'axe œstrogénique en mode enrichi en T permet de détecter l'inhibition de la signalisation de l'axe œstrogénique provoquée par l'antagonisme des ER, l'inhibition de l'aromatase ou la répression de l'expression de l'aromatase. Elle permet également de détecter l'induction de la signalisation de l'axe œstrogénique par des mécanismes tels qu'une expression accrue de l'aromatase. Pour ce témoin, on réunit les données de deux puits afin de renforcer la fiabilité de la valeur de fluorescence moyenne. Ceci est requis puisque la variabilité pour ce groupe témoin est plus élevée que pour le milieu d'essai ou le groupe traité par le solvant car la fluorescence est induite par le traitement à la testostérone.
- d. Témoin induction pour les groupes avec ajouts dosés (mode enrichi) : 1 puits avec 8 organismes par puits est exposé à 64 ng/L d'EE2 ainsi qu'à 30 µg/L de T. Ce groupe témoin permet de confirmer que l'on peut observer une induction de la fluorescence supérieure à celle observée pour le groupe témoin T 30 µg/L. Dans le cadre d'un essai dynamique de 21 jours (7) sur le médaka, la concentration de 64 ng/L d'EE2 est la plus basse concentration à avoir un effet physiologique, à savoir le développement d'un ovotestis chez un tiers des poissons-boule à grosse tête mâles (24).
- e. Témoin inhibition pour les groupes avec ajouts dosés (mode enrichi) : 1 puits avec 8 organismes par puits est exposé à 10 µg/L de fadrozole ainsi qu'à 30 µg/L de T. À une concentration de 10 µg/L, le fadrozole induit une modification du rapport gonadosomatique (RGS) chez les poissons mâles dans le cadre d'un protocole d'essai établi par l'OCDE (OCDE, LD 229 ; (6) (25).

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 qualité. Ils fournissent une courbe

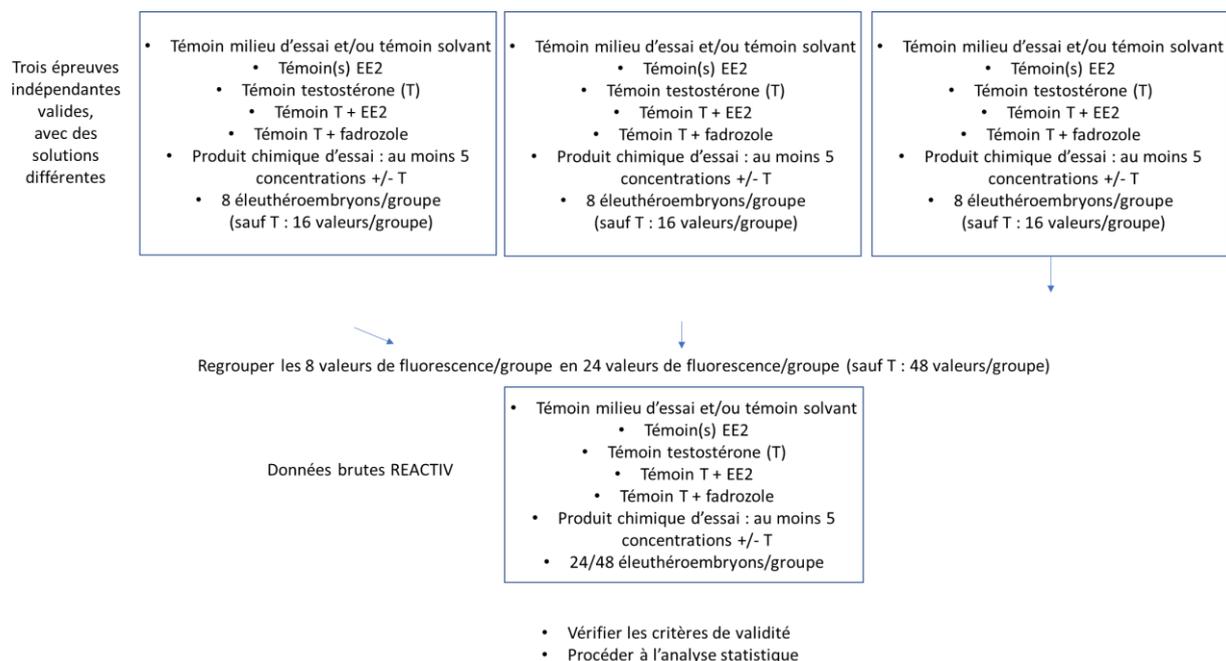
d'étalonnage de l'EE2 et peuvent être utilisés pour obtenir une relation concentration-réponse pour l'EE2, ce qui permet d'exprimer les résultats en équivalents EE2. Le calcul des valeurs d'équivalence n'est pas requis et n'a qu'un but informatif, le résultat de l'essai visant uniquement à déterminer 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.

- f. Témoin EE2 34 ng/L : 1 puits avec 8 organismes est exposé à 34 ng/L d'EE2.
- g. Témoin EE2 51 ng/L : 1 puits avec 8 organismes est exposé à 51 ng/L d'EE2.
- h. Témoin EE2 76 ng/L : 1 puits avec 8 organismes est exposé à 76 ng/L d'EE2.
- i. Témoin EE2 114 ng/L : 1 puits avec 8 organismes est exposé à 114 ng/L d'EE2.
- j. Témoin EE2 171 ng/L : 1 puits avec 8 organismes est exposé à 171 ng/L d'EE2.

Si l'essai est réalisé avec un 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'essai est considéré comme invalide (voir également §37).

Épreuves expérimentales

17. Un essai comprend trois épreuves indépendantes valides, et nécessite 1 puits contenant 8 organismes par groupe de traitement et par épreuve (voir Graphique 1). Au moins cinq concentrations du produit chimique d'essai doivent être évaluées en présence et en l'absence de T. Il convient d'évaluer à chaque épreuve les mêmes concentrations du produit soumis à l'essai. On utilisera des solutions indépendantes pour chaque épreuve (voir §42). Les épreuves sont conduites avec des éléuthéroembryons issus de différentes pontes. Elles peuvent être conduites séquentiellement ou simultanément. 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 $n = 24$ valeurs de fluorescence pour chaque groupe de traitement, sauf pour le témoin T qui fournira idéalement un total de $n = 48$ valeurs. Le regroupement des données, obligatoire pour cet essai, s'effectue indépendamment du fait que les épreuves individuelles présentent des réponses positives ou négatives. Il sert à fournir une meilleure estimation de la valeur de fluorescence moyenne pour chaque groupe expérimental.



Graphique 1. Aperçu de l'essai REACTIV. (« +/- T » désigne les groupes avec/sans ajouts dosés.)

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI

- Les informations disponibles sur le produit chimique d'essai doivent figurer dans le rapport (voir §59).
- 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. Pour plus d'informations sur la validation des méthodes d'analyse quantitative, on se reportera au Document-guide 204 (26). La détermination analytique de la concentration de produit chimique d'essai sera effectuée conformément aux modalités décrites au §43.

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

Quantification de la fluorescence

- L'essai REACTIV 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 page

dynamique adaptée de mesures de fluorescence. Ces expériences sont décrites à l'Annexe 3 et doivent être réalisées en cas de changement d'équipement ou de changement des paramètres de l'équipement. 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 (voir Annexe 6). 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 positionnés ou un signal de fluorescence sans lien avec l'activation de l'axe œstrogénique (poussières ou fibres fluorescentes, produit chimique d'essai fluorescent accumulé dans les éléuthéroembryons, profil de fluorescence anormal).

Produits chimiques d'épreuve de compétence

21. 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. Les limites de signification statistique attendues, indiquées dans le Tableau 1, concernent la fluorescence du groupe exposé à la concentration indiquée des produits chimiques de référence par rapport au témoin correspondant. Ces limites ont été établies lors de l'exercice de validation de l'essai REACTIV par l'OCDE (OCDE, Rapport de validation de l'essai REACTIV).

Tableau 1 : Produits chimiques d'épreuve de compétence – anastrozole, tamoxifène, aténolol et saccharine.

Produit chimique	N° CAS	Catégorie	Concentrations d'essai	Limite de signification statistique attendue
Anastrozole	120511-73-1	Actif	20, 4, 0.8, 0.16, 0.032 µg/L	4 µg/L
Tamoxifène	10540-29-1	Actif	483, 242, 121, 60.4, 30.2 µg/L	483 µg/L
Aténolol	29122-68-7	Inerte	100, 10, 1, 0.1, 0.01 mg/L	Inerte
Saccharine	82385-42-0	Inerte	100, 10, 1, 0.1, 0.01 mg/L	Inerte

Validité de l'essai

22. Pour que les résultats de l'essai soient valides, chacun des critères suivants doivent être remplis pour chaque épreuve. Si un seul des critères n'est pas satisfait, l'épreuve est considérée comme invalide.

- La mortalité ou l'immobilisation ne doit pas concerner plus de deux éléuthéroembryons pour le groupe témoin T.
- Dans tous les autres groupes témoins obligatoires, et dans au moins les quatre groupes avec la concentration d'essai la plus basse, en présence et en l'absence de T, la mortalité ou l'immobilisation ne doit pas concerner plus d'un éléuthéroembryon. Tous les groupes autres que les groupes témoins obligatoires et les quatre groupes avec la concentration d'essai la plus basse qui ne remplissent pas ces critères doivent être considérés comme compromis, et les données associées doivent être exclues de l'analyse finale.
- Les données invalides dues à des éléuthéroembryons mal positionnés (voir Annexe 7) ne doivent pas concerner plus de deux éléuthéroembryons dans le groupe témoin T.
- Dans tous les autres groupes témoins obligatoires, et dans au moins les quatre groupes avec la concentration d'essai la plus basse, en présence et en l'absence de T, les données invalides dues à des éléuthéroembryons mal positionnés ne doivent pas concerner plus d'un éléuthéroembryon. Tous les groupes autres que les groupes témoins obligatoires et les quatre groupes avec la concentration d'essai la plus basse qui ne remplissent pas ces critères doivent être considérés comme compromis, et les données associées doivent être exclues de l'analyse finale.
- Une induction de fluorescence statistiquement significative doit être observée pour le témoin EE2 488 ng/L et le témoin T 30 µg/L par rapport au témoin solvant si l'on en utilise un, ou par rapport au témoin contenant le milieu d'essai dans le cas contraire. La valeur de fluorescence pour le témoin EE2 488 ng/L doit être au moins 500% du témoin négatif correspondant. La valeur de fluorescence pour le témoin T 30 µg/L doit être au moins 2 fois supérieure à celle du témoin négatif correspondant.

Si une ou plusieurs épreuves sont invalidées, on devra procéder à une ou plusieurs épreuves supplémentaires afin d'obtenir trois épreuves valides. Tout épreuve invalide doit être consignée dans le rapport d'essai.

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

- Une induction de fluorescence statistiquement significative doit être observée pour le témoin T + EE2 par rapport au témoin T.
- Une inhibition de fluorescence statistiquement significative doit être observée pour le témoin T + fadrozole par rapport au témoin T.
- 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

23. On utilise du matériel courant de laboratoire, et en particulier :
- incubateur de laboratoire ou 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 embryons et éléuthéroembryons) ;
 - microscope à fluorescence équipé de filtres passe-haut GFP et d'une caméra couleur pour la quantification de la fluorescence (OCDE, Rapport de validation de l'essai REACTIV) ;
 - logiciel d'analyse d'images ;
 - instruments d'analyse adaptés au produit chimique d'essai ou recours à des services d'analyse extérieurs.

Si des plaques en plastique ne sont pas appropriées pour un produit chimique donné, on les remplacera par des récipients en verre (p. ex. boîtes de Petri de petit diamètre).

Organisme d'essai

24. Les organismes utilisés pour l'essai REACTIV sont des éléuthéroembryons homozygotes de médaka japonais *O. latipes* de la lignée transgénique *chgh-gfp*. Ces organismes doivent être produits en accouplant deux médakas japonais *chgh-gfp* homozygotes. Plusieurs laboratoires assurent la production de la lignée transgénique *chgh-gfp* (voir 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 §31).
25. La phase d'exposition de l'essai commence avec des éléuthéroembryons à JAE0 (environ 10 jours après fécondation à 26 °C ou 7 jours après fécondation à 30 °C). Les éléuthéroembryons doivent être à JAE0, mais le nombre de jours après fécondation (JAF) peut varier. Cependant, cette différence ne doit pas dépasser 1 JAF pour une même épreuve. Les différents groupes d'essai doivent être constitués

- d'éléuthéroembryons sélectionnés de manière aléatoire. Les éléuthéroembryons doivent soit être élevés dans le laboratoire à partir d'animaux reproducteurs appartenant au laboratoire, soit provenir d'œufs expédiés depuis un autre laboratoire (voir Annexe 10) ; dans ce deuxième cas, on s'assurera 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 3.
26. 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* (27)(28) ou dans les Lignes directrices de l'Agence pour la protection de l'environnement (EPA, *Environmental Protection Agency*) des États-Unis relatives à la culture du médaka japonais, *Oryzias latipes* (29).
 27. L'intégrité de la lignée transgénique *chgh-gfp* doit être vérifiée à chaque génération en utilisant un ensemble complet de témoins, y compris les témoins optionnels (voir §16), et en s'assurant du respect de tous les critères de validité et de l'obtention du profil de réponse attendu pour les témoins EE2 (voir §16). La transmission du transgène et la réponse GFP sont stables depuis plus de 20 générations.
 28. 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 41 à la fin de l'essai.

Milieu d'essai

29. Le milieu d'essai peut être un milieu médaka (voir 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 4 certaines caractéristiques chimiques d'une eau 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 constitue un milieu d'essai approprié.

Alimentation

30. Des éléuthéroembryons entre les stades de développement JAE0 (début de l'essai) et JAE1 (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 (30). 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

31. La présente Ligne directrice ne doit pas être appliquée à des produits chimiques d'essai émettant une fluorescence comprise 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 œstrogénique. Un protocole simple permettant de déterminer si le produit chimique d'essai émet une fluorescence à ces longueurs d'onde consiste à placer 200 μ L/puits d'une solution du produit chimique à la concentration la plus élevée prévue pour l'essai REACTIV dans dix puits d'une plaque 96 puits. Dix puits supplémentaires d'une plaque 96 puits doivent ensuite être remplis avec 200 μ L/puits de milieu d'essai. La fluorescence est alors quantifiée en utilisant le même appareillage et les mêmes paramètres que pour la quantification de la fluorescence des éléuthéroembryons. 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 convient de 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 ± 1 °C pendant 24 ± 1 h, avec la concentration de produit chimique la plus élevée prévue pour l'essai REACTIV. 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 REACTIV. Si le produit chimique d'essai induit une fluorescence aussi bien en mode enrichi qu'en mode non enrichi dans le cadre d'un essai REACTIV, cela peut signifier qu'il est métabolisé

en un métabolite fluorescent. Il convient alors d'examiner les images pour établir si la fluorescence est limitée au foie. 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

32. La concentration maximale tolérée (CMT) est théoriquement définie comme la concentration d'essai la plus élevée du produit chimique entraînant moins de deux cas de mortalité ou l'immobilisation dans chacune des trois épreuves individuelles (moins de deux morts par groupe et par épreuve). Le laboratoire procédera à un essai de détermination de la gamme des concentrations sur des éléuthéroembryons *O. latipes* de type sauvage ou de préférence de lignée *chgh-gfp* pour évaluer la toxicité éventuelle. Il est nécessaire de prendre également en considération les éléuthéroembryons immobiles ainsi que les morts afin de s'assurer que les résultats obtenus sont biologiquement pertinents.
33. Cet essai 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 est requise pour les concentrations d'essai choisies et le témoin. L'essai de détermination de la gamme des concentrations est réalisé sur huit éléuthéroembryons, avec 8 mL de solution d'exposition par puits, un puits par concentration d'essai et un puits pour le témoin. Le pourcentage d'éléuthéroembryons présentant une mortalité ou l'immobilisation est calculé sur l'ensemble des huit éléuthéroembryons exposés à la même concentration d'essai ou au témoin. La concentration la plus élevée utilisée pour déterminer la gamme doit entraîner plus d'un cas de mortalité ou l'immobilisation, sauf si la concentration d'essai la plus élevée est 100 mg/L ou la limite de solubilité du produit chimique d'essai. Pour que les résultats soient valides, on ne doit pas observer plus d'un cas de mortalité ou d'éléuthéroembryons immobilisés dans le groupe témoin de l'essai de détermination de la gamme. Une épreuve valide est généralement suffisante pour déterminer la concentration induisant moins de deux cas de mortalité ou d'immobilisation.
34. La concentration d'essai maximale sera établie en fonction de la plus faible des valeurs suivantes : limite de solubilité du produit chimique d'essai dans le milieu d'essai, concentration induisant moins de deux cas de mortalité ou d'immobilisation ou concentration maximale de 100 mg/L.

Gamme de concentrations d'essai

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

Solutions d'essai

36. 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 23 de l'OCDE sur les essais de toxicité aquatique en phase aqueuse des produits chimiques difficiles à tester (23).
37. Selon la solubilité dans l'eau du produit chimique testé, il est possible de préparer les solutions d'exposition sans solvant ou avec une concentration maximale de solvant de 100 mg/L (0.01 %), conformément aux indications du Document-guide 23 de l'OCDE (23), s'il est confirmé que le solvant choisi et la concentration de solvant utilisée pour dissoudre le produit soumis à l'essai 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 §22). La Ligne directrice a été validée en utilisant du diméthylsulfoxyde (DMSO) exclusivement, à une concentration finale de 0.2 %, sans génération de faux positifs. Par conséquent, l'essai peut être réalisé avec 0.1 % de DMSO, conformément au Document-guide de l'OCDE n° 23 (23), du moment que les critères de validité sont remplis. Les essais effectués dans le laboratoire chef de file montrent une performance normale des groupes témoins quand l'essai a été conduit avec 0.01% de DMSO (voir l'annexe 11).
38. 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, dont l'objectif sera d'établir la concentration de solvant maximale avec laquelle on observe une absence de mortalité ou l'immobilisation, ainsi qu'une absence d'activité endocrinienne. Il faut également tenir compte de l'action éventuelle du solvant sur l'axe de la reproduction (31).
39. Les solutions témoins doivent être préparées le premier jour d'une épreuve. Chaque épreuve indépendante nécessite une nouvelle préparation des solutions d'essai et des solutions témoins. Les solutions conservées à 4 °C doivent atteindre 26 ± 1 °C avant leur mise en contact avec les éléuthéroembryons afin d'éviter tout choc thermique.

MODE OPÉRATEUR

Conditions d'exposition

40. 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 doit contenir huit organismes dans 8 mL de solution d'exposition ou de solution témoin (voir §16 pour la liste des groupes témoins).
41. Les éléuthéroembryons sont maintenus dans un incubateur pendant 24 ± 1 h à 26 ± 1 °C, avec un cycle de 14 heures de lumière et de 10 heures d'obscurité.
42. Un nouvel ensemble de solutions d'exposition doit être préparé pour chacune des trois épreuves de l'essai REACTIV.

Dosages analytiques

43. La méthode d'exposition utilisée comportant un renouvellement statique à des intervalles de 24 h, il convient de documenter la stabilité de la concentration du produit chimique d'essai. Dans l'idéal, la stabilité du produit doit permettre à la concentration d'exposition de demeurer à ± 20 % de la concentration nominale pendant 24 h. L'exigence minimale pour les dosages analytiques est l'ensemble minimal d'échantillons scientifiquement valable, selon les besoins de l'autorité réglementaire. Le Document-guide 23 de l'OCDE fournit des indications sur cette question (23). Si les concentrations ne peuvent être maintenues à ± 20 % dans le système d'essai, il est possible d'envisager des intervalles de renouvellement plus courts. L'utilisation de la moyenne géométrique des concentrations mesurées est autorisée pour les produits chimiques qui ne demeurent pas à 80-120 % de la concentration nominale. Le chapitre 5 du Document-guide 23 de l'OCDE fournit de plus amples informations à ce sujet (23).

Lancement et conduite de l'essai

Lancement de l'essai au jour 0

44. L'exposition débute le jour de l'éclosion des éléuthéroembryons (JAE0).
45. 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 (voir 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, visible à l'œil nu, sont éliminés. Les lots d'éleuthéroembryons contenant moins de 80 % d'éleuthéroembryons normaux et sains à JAE0 (à l'exclusion des œufs morts ou non fécondés retirés suite à la collecte des œufs) 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.

46. Pour commencer l'essai, on place huit éleuthéroembryons, sélectionnés de façon aléatoire, dans chaque puits d'une plaque 6 puits (chaque puits pouvant être remplacé par un récipient en verre), dans des gouttes de milieu d'essai (voir §29), au moyen d'une pipette de transfert. On retire le milieu d'essai en excès, puis on ajoute les solutions de produit chimique d'essai pour la première fois. Il convient de veiller à travailler sur une seule plaque à la fois afin d'éviter le dessèchement des éleuthéroembryons.

Quantification de la fluorescence au jour 1

47. Au bout de 24 ± 1 h d'exposition, on commence par retirer les organismes morts et par remplacer le milieu d'exposition par le milieu d'essai (voir §29). Cela évite que la personne effectuant la lecture de la fluorescence ne soit exposée au produit chimique d'essai. Immédiatement après, on quantifiera la fluorescence de chaque organisme. Toutes les observations doivent être consignées. Si l'on observe plus d'un cas de mortalité ou des éleuthéroembryons immobilisés dans l'un des groupes témoins obligatoires ou dans un ou plusieurs des quatre groupes de traitement avec la concentration la plus basse, on considèrera l'épreuve indépendante en cours comme compromise, et on y mettra fin. 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 à fond transparent. 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 une surface en plastique noir en cas d'acquisition des images par le dessus ou des plaques 96 puits à fond transparent en cas d'acquisition des images par le dessous. On procède ensuite à l'imagerie en utilisant une caméra couleur et des filtres passe-haut GFP. Il convient d'acquérir une image de la région ventrale incluant le foie de chaque organisme, avec les paramètres définis lors de l'étalonnage. L'Annexe 7 fournit des exemples de la façon dont les éleuthéroembryons doivent être positionnés pour l'imagerie.

Fin de l'essai

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

Analyse des données / Évaluation des résultats de l'essai**Considérations relatives à l'analyse des données**

49. Les mesures de fluorescence provenant d'images d'éléuthéroembryons mal positionnés (voir Annexe 7) doivent être éliminées des données avant l'analyse.
50. 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 (32). Pour exclure l'autofluorescence (fluorescence endogène des éléuthéroembryons, 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 bien 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 la couche verte et dans la couche rouge. Selon le système d'imagerie, il peut s'avérer 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 que l'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 tous les essais qui suivent (voir §22 et Annexe 6).
51. Les données des trois épreuves indépendantes sont réunies afin d'obtenir 18 à 24 valeurs de fluorescence pour chaque concentration d'essai ou témoin valide (36 à 48 valeurs pour le témoin T). Le nombre maximal de valeurs est 24 (48 pour le témoin T), puisque 8 éléuthéroembryons sont utilisés par épreuve pour chaque condition d'essai ou témoin (16 pour le témoin T) et que l'essai REACTIV comporte trois épreuves. Le seuil inférieur de 18 valeurs (36 pour le témoin T) est la limite correspondant à un cas de mortalité ou des éléuthéroembryons immobilisés par épreuve et un éléuthéroembryon mal positionné par épreuve, soit 6 valeurs par épreuve (12 pour le témoin T).

52. La réalisation de trois épreuves indépendantes vise à accroître la robustesse de l'essai. Pour déterminer si le produit chimique d'essai est actif ou inerte, on se basera exclusivement sur l'ensemble des données réunies.
53. Si un solvant est utilisé lors de l'essai, il convient d'évaluer ses effets éventuels. Pour cela, on procédera à une comparaison statistique du groupe témoin solvant et du groupe témoin milieu d'essai. Si l'on observe une différence statistiquement significative entre le témoin milieu d'essai et le témoin solvant sur l'ensemble des valeurs des trois épreuves, il convient de se demander si le solvant a interféré avec l'intégrité de l'essai et si les résultats répondent aux objectifs pour lesquels les données ont été collectées. Il est important de vérifier si le solvant choisi remplit tous les critères de validité (voir §22 et §37). 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

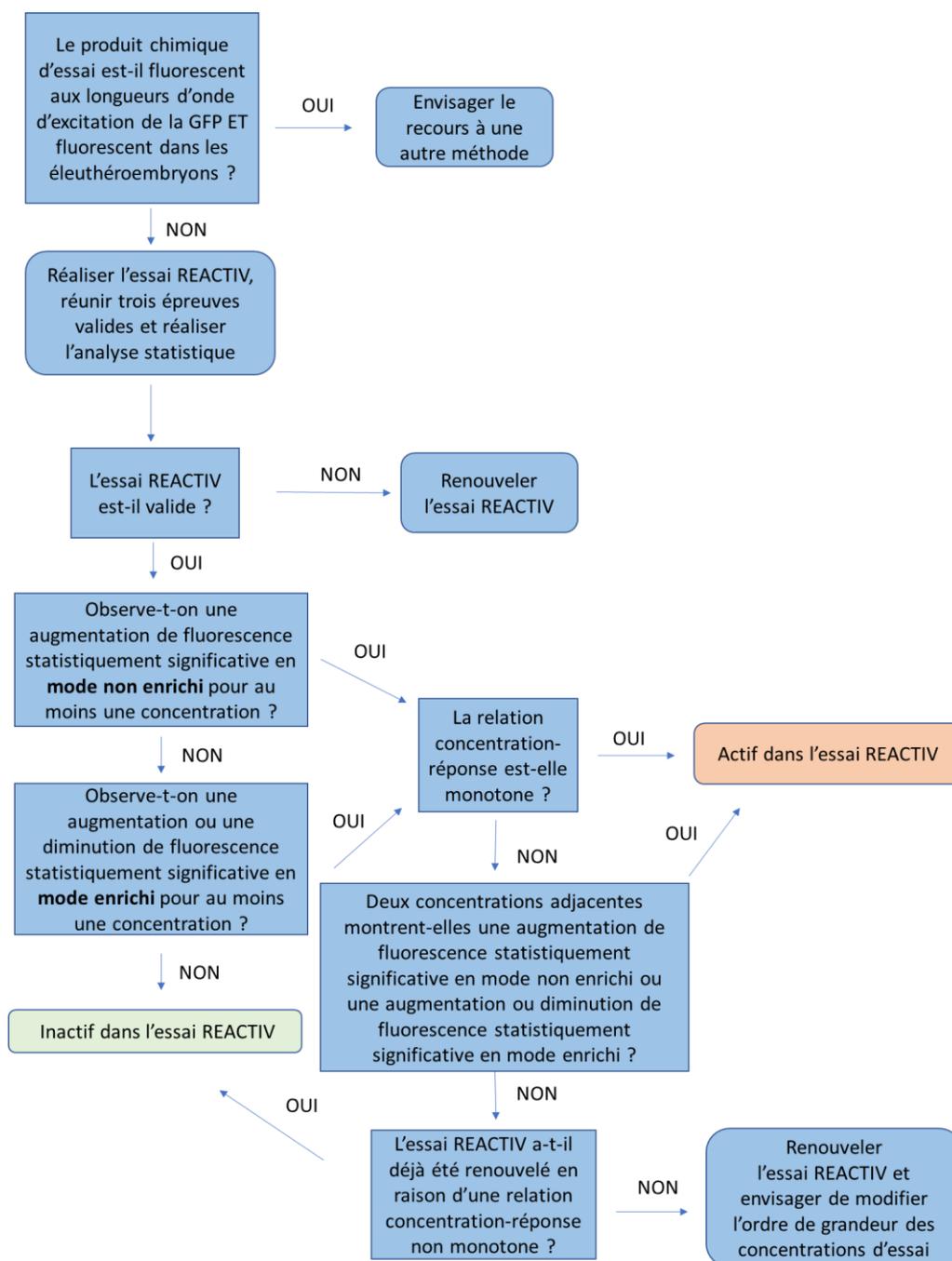
54. Des méthodes statistiques appropriées seront utilisées conformément au Document 54 de l'OCDE sur les approches actuelles de l'analyse statistique des données d'écotoxicité et leur application (33). En règle générale, les effets du produit chimique d'essai sur la fluorescence par rapport au témoin sont analysés au moyen d'un test d'hypothèse bilatéral pour $p < 0.01$.
55. 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). Il est également possible de s'appuyer sur une approche ANOVA mixte (ou approche ANOVA hiérarchique). Cette approche est décrite plus en détail à l'Annexe 8. Contrairement à l'approche mentionnée ci-avant, l'approche ANOVA mixte est préférée car elle tient compte de la variabilité entre les épreuves ainsi que de l'interaction entre l'épreuve et le traitement. Cela a l'avantage de permettre des essais plus précis, en prenant en considération la structure de dépendance des données.

Diagramme de décision

56. En mode non enrichi, une concentration active est définie comme une concentration donnant une augmentation de fluorescence statistiquement significative par rapport au témoin milieu d'essai / témoin solvant (voir §53). Une concentration produisant une diminution de fluorescence statistiquement significative comparée au milieu d'essai

du témoin/témoin contenant le solvant dans un mode non enrichi en T n'est pas considéré comme une concentration active et est ignorée dans l'évaluation de l'activité oestrogénique. Une diminution de la fluorescence et les effets potentiels antagonistiques sont uniquement évalués dans le mode enrichi en T. Des diminutions significatives de la fluorescence dans le mode non-enrichi sont liées à la variation biologique de l'auto-fluorescence et sont considérés comme des résultats fortuits.

57. En mode enrichi en T, une concentration active est définie comme une concentration donnant une augmentation ou une diminution de fluorescence statistiquement significative par rapport au témoin T 30 µg/L.
58. Un diagramme de décision a été élaboré pour l'essai REACTIV 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 REACTIV si au moins une concentration d'essai est active en mode non enrichi ou enrichi en T et si une relation concentration-réponse monotone est observée (c'est-à-dire qu'il s'agit de la concentration d'essai la plus élevée). Un produit chimique est en outre considéré comme actif si au moins deux concentrations d'essai sont actives soit en mode non enrichi, soit en mode enrichi en T, et si une relation concentration-réponse non monotone est observée, sous réserve qu'au moins deux concentrations adjacentes soient actives. En mode non enrichi, au moins deux concentrations adjacentes doivent montrer une augmentation de fluorescence statistiquement significative. En mode enrichi en T, au moins deux concentrations actives adjacentes doivent montrer une augmentation de fluorescence statistiquement significative, ou bien une diminution de fluorescence statistiquement significative.



Graphique 2. Diagramme de décision pour l'interprétation des résultats de l'essai REACTIV.

RAPPORT D'ESSAI

59. 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, volatilité, 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 [34] et LD 310 [35]).
- 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 de tout essai réalisé en vue de déterminer la fluorescence éventuelle du produit chimique d'essai.

Espèce utilisée pour l'essai

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

Conditions de l'essai

- Mode opératoire (notamment concentrations d'essai, température, durée, exposition statique, 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 du milieu d'essai artificiel utilisé, ainsi que toutes les mesures réalisées.
- Méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement, s'il y a lieu (indiquer le solvant utilisé et sa concentration, le cas échéant).
- Marque et références des plaques 6 puits utilisées pour l'exposition ainsi que de toutes les plaques utilisées pour la quantification de la fluorescence.
- Références et réglages du microscope à fluorescence utilisé pour la quantification. Méthode utilisée pour l'analyse des images.

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.
- Nombre d'organismes morts et organismes immobilisés dans chaque épreuve ainsi que groupe(s) et jour(s) de survenue. Les organismes morts sont définis comme ceux qui sont blancs et clairement en décomposition, les organismes immobilisés sont ceux ayant une apparence normale mais non réactifs à l'agitation du milieu.
- 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, y compris quand toute épreuve invalidée a dû être répétée.
- 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 en mode 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 œstrogénique à l'issue de l'essai REACTIV.

BIBLIOGRAPHIE

1. Spirhanzlova, P. *et al.* (2016) Oestrogen reporter transgenic medaka for non-invasive evaluation of aromatase activity. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, **179**, 64–71.
2. 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>.
3. 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>.
4. 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>.
5. 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>.
6. 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>.
7. 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>.
8. OECD (2011) 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>.
9. OECD (2023) Test No. 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT), Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264242258-en>
10. OECD (2022) Test No. 251: Rapid Androgen Disruption Activity Reporter (RADAR) assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/da264d82-en>.
11. OECD (2023) Guidance Document No. 379: Guidance document on a juvenile medaka anti-androgen screening (JMASA). [https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO\(2023\)15/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO(2023)15/en/pdf)
12. Kurauchi, K. *et al.* (2005) *In vivo* visual reporter system for detection of estrogen-like substances by transgenic medaka. *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 2762–2768.
13. Kurauchi, K. *et al.* (2008) Characteristics of ChgH-GFP transgenic medaka lines, an *in vivo* estrogenic compound detection system. *Mar. Pollut. Bull.*, **57**, 441–444.
14. OECD (2024) Validation Report of the REACTIV assay, No. 394, Series on Testing and Assessment, ENV Publications, OECD, Paris [https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO\(2024\)9/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO(2024)9/en/pdf)
15. Hornung, M.W. *et al.* (2007) Tissue distribution and metabolism of benzo[a]pyrene in embryonic and larval medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicol. Sci.*, **100**, 393–405.
16. Kashiwada, S. *et al.* (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.
17. 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.
18. Vignet *et al.* (2019) Imidacloprid induces adverse effects on fish early life stages that are more severe in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) than in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Lett.* **7**;132(1):65-70.

19. Schulz-Jander *et al.* (2002a) Neonicotinoid insecticides: reduction and cleavage of imidacloprid nitroimine substituent by liver microsomal and cytosolic enzymes. *Chem Res Toxicol.*, **15**(9), 1158-65.
20. Schulz-Jander *et al.* (2002b) Imidacloprid insecticide metabolism: human cytochrome P450 isozymes differ in selectivity for imidazolidine oxidation versus nitroimine reduction. *Toxicol Lett.*, **132**(1), 65-70.
21. Schiller *et al.* (2014) Species-specific considerations in using the fish embryo test as an alternative to identify endocrine disruption. *Aquat Toxicol.*, 155, 62-72.
22. Liu *et al.* (2022) Medaka embryos as a model for metabolism of anabolic steroids. *Arch Toxicol.*, 96(7), 1963-1974
23. OECD (2019b) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/0ed2f88e-en>.
24. Seki, M. *et al.* (2002) Effect of ethinylestradiol on the reproduction and induction of vitellogenin and testis-ova in medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**, 1692–1698.
25. Ankley, G.T. *et al.* (2002) Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.*, **67**, 121–130.
26. OECD (2014) Guidance document No. 204 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, series on Biocides No. 9.
27. Kinoshita, M. *et al.* (2009) Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols John Wiley & Sons.
28. Murata, K. *et al.* (2019) Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols John Wiley & Sons.
29. Denny, J.R. *et al.* (1991) Guidelines for the culture of the medaka, *Oryzias latipes*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/3-91/064 (NTIS PB92137496).
30. Iwamatsu, T. (2004) Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.*, **121**, 605–618.
31. Hutchinson, T.H. *et al.* (2006) Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: a critical review. *Aquat. Toxicol.*, **76**, 69–92.
32. Schindelin, J. *et al.* (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, **9**, 676–682.
33. OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264085275-en>.
34. 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>.
35. OECD (2014b) Test No. 310: Ready Biodegradability - CO₂ in sealed vessels (Headspace Test), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264224506-en>.
36. Bates, D. *et al.* (2015) Fitting linear mixed-effects models using ime4. *J. Stat. Softw.*, 67, 1–48.
37. Green, J. W. *et al.* (2018). Statistical Analysis of Ecotoxicity Studies. John Wiley & Sons, Ltd.

ANNEXE 1. ABRÉVIATIONS ET DÉFINITIONS

spg1-gfp : lignée transgénique de médaka porteuse d'une construction génétique composée de 2.047 kilobases (kb) du promoteur du gène choriogénine H du médaka en amont de la séquence codante de la GFP.

DMSO : diméthylsulfoxyde.

JAF : jour après fécondation.

JAE : jour après éclosion.

EE2 : 17 α -éthinyloestradiol, agoniste de synthèse des récepteurs des œstrogènes.

CEX : Concentration médiane létale est la concentration d'un produit chimique testé qui est estimé être létal à x% pour l'organisme d'essai dans la durée de l'essai.

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. Dans certaines juridictions, la période éleuthéroembryonnaire est considérée comme un stade de vie non protégé dans ce contexte ((OECD, 2014c). 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).

Axe œstrogénique : dans ce contexte, se rapporte à la stéroïdogénèse en aval et à l'activation/l'antagonisme des récepteurs des œstrogènes. On ne dispose actuellement d'aucune donnée sur la réactivité de l'essai REACTIV à des modulateurs de la stéroïdogénèse en amont.

Fad : fadrozole, un produit pharmaceutique inhibiteur de l'aromatase.

GFP : protéine fluorescente verte.

Eleuthéroembryons immobiles : éleuthéroembryons qui ne se déplacent pas, et montrent une absence complète ou presque complète de réaction au stimuli (c.à.d. secousse fortes de la plaque à six puits ou stimulation au moyen d'une extrémité de pipette). Ceci est évalué sur une période de 10 secondes.

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 a un effet statistiquement significatif (à $p < 0.05$).

MS-222 : méthanesulfonate de tricaine (CAS : 886-86-2).

CMT : concentration maximale tolérée (CMT). La CMT est théoriquement définie comme la concentration d'essai la plus élevée du produit chimique à laquelle moins de deux mortalités dans chacune des trois épreuves (moins de deux mortalités par groupe et par épreuve). Cependant les embryons immobilisés devraient également être considérés lors de la détermination de la concentration maximale tolérée afin de s'assurer de la pertinence biologique des résultats.

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

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

ETM : erreur-type de la moyenne.

SMILES : spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée.

Mode enrichi (avec ajouts dosés) : partie d'un essai REACTIV réalisée en présence de 30 $\mu\text{g/L}$ de T.

T : testostérone.

Organisme transgénique : organisme présentant un nouveau matériel génétique, par exemple

synthétique ou dérivé à l'origine d'espèces différentes, qui a été inséré dans le génome à l'aide de techniques de recombinaison de l'ADN.

Mode non enrichi (sans ajouts dosés) : partie d'un essai REACTIV réalisée en l'absence de T.

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

ANNEXE 2. CONDITIONS DE L'ESSAI REACTIV

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

Animal d'essai	Éleuthéroembryon <i>O. latipes chgh-gfp</i>
Effet mesuré	Fluorescence de chaque éleuthéroembryon
Période d'exposition	De JAE0 (début de l'essai) à JAE1 (fin de l'essai)
Durée de l'exposition	24 h ± 1 h
Régime d'exposition	Renouvellement statique ; pas d'alimentation
pH	6.5 à 8
Conditions d'incubation pendant l'exposition	26 ± 1 °C ; cycle de 14 heures de lumière et de 10 heures d'obscurité
Nombre d'éleuthéroembryons par condition d'essai et par groupe témoin	8 organismes par puits (plaque 6 puits) x 1 puits (total de 8 organismes par concentration et par épreuve), sauf pour le témoin testostérone qui comprend 2 puits avec 8 organismes par puits
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> (voir §29)
Nombre d'épreuves	3 épreuves pour chaque produit chimique d'essai avec des solutions fraîchement préparées
Critères de sélection des individus inclus dans l'essai	Stade de développement (JAE0), santé des organismes (vivants et sans malformations)
Critères de validité	Pour chaque épreuve : mortalité ou l'immobilisation ≤ 1 dans tous les groupes témoins obligatoires et dans au moins les quatre groupes avec la concentration d'essai la plus basse, en présence et en l'absence de T (≤ 2 pour le témoin T) ; données invalides dues à des éleuthéroembryons mal positionnés ≤ 1 dans tous les groupes témoins obligatoires et dans au moins les quatre groupes avec la

	<p>concentration d'essai la plus basse, en présence et en l'absence de T (≤ 2 pour le témoin T).</p> <p>Pour l'ensemble des trois épreuves : induction de fluorescence statistiquement significative pour le témoin EE2 488 ng/L et le témoin T par rapport au témoin solvant ou au témoin milieu d'essai correspondant ; valeur de fluorescence moyenne au moins 500% celle du témoin négatif correspondant pour le témoin EE2 488 ng/L et au moins 200% pour le témoin T ; induction de fluorescence statistiquement significative pour le témoin T + EE2 par rapport au témoin T ; inhibition de fluorescence statistiquement significative pour le témoin T + fadrozole par rapport au témoin T.</p> <p>Au moins quatre concentrations d'essai non compromises, qui doivent inclure les quatre concentrations d'essai les plus basses. 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. Dans le cadre d'une épreuve, une concentration d'essai (8 individus) est dite non compromise lorsque la mortalité ou l'immobilisation est ≤ 1 éléuthéroembryon (≤ 2 pour le témoin T) et que le nombre de données invalides dues à des éléuthéroembryons mal positionnés est ≤ 1 éléuthéroembryon (≤ 2 pour le témoin T).</p>
<p>Concentration du produit chimique d'essai</p>	<p>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</p>

		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 témoin solvant	Milieu d'essai et/ou milieu d'essai + solvant
	17 α -éthinyloestradiol (EE2)	EE2 (488 ng/L)
	Testostérone (T)	T 30 μ g/L (2 puits de 8 éléuthéroembryons)
	T + EE2	T (30 μ g/L) + EE2 (64 ng/L)
	T + fadrozole	T (30 μ g/L) + fadrozole (10 μ g/L)

ANNEXE 3. 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 REACTIV

- Ne pas mélanger des embryons fécondés à des jours différents quand ils sont élevés jusqu'à éclosion.
- 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 REACTIV.
- 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 sous un éclairage à 26 °C environ, avec 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 JAF7-10 (tolérance : JAF 7-12). Les éleuthéroembryons doivent être à JAE0, mais le nombre de jours après fécondation (JAF) peut varier. Cependant, cette différence ne doit pas dépasser 1 JAF 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 4. QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU ACCEPTABLE POUR L'ÉLEVAGE D'EMBRYONS DE MÉDAKA

Tableau 33. Caractéristiques d'une eau convenant à l'élevage d'embryons de médaka jusqu'à l'éclosion.

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

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.

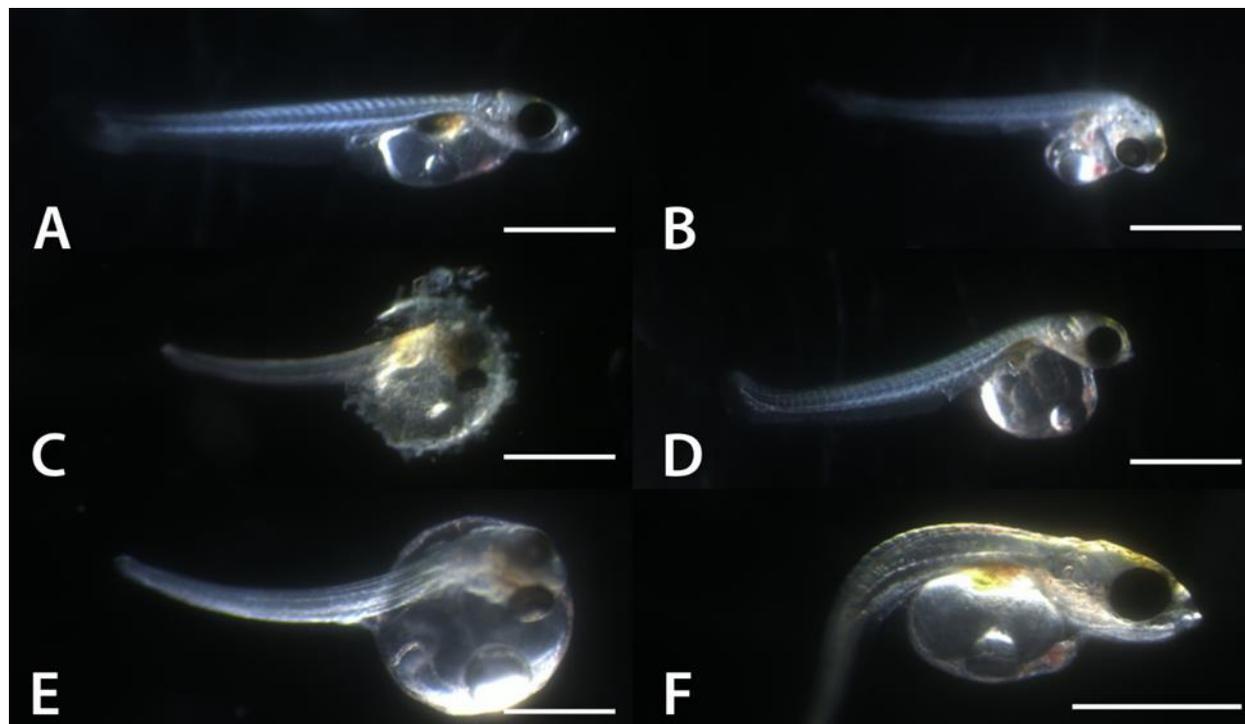
Une solution mère de milieu médaka 10X présente la composition suivante :

- NaCl 5 g/L
- CaCl₂ 0.151 g/L
- MgSO₄ 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 5. 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, cet éleuthéroembryon n'est pas encore complètement sorti de son œuf ; (D et E) sous-développés, ces deux éleuthéroembryons ont un sac vitellin très grand pour un médaka éclos, présentant encore une forme sphérique ; (F) malformé, cet éleuthéroembryon a la queue incurvée vers le bas. Les barres d'échelle représentent 1 mm.

ANNEXE 6. ÉTALONNAGE : RÉGLAGE OPTIMAL DES PARAMÈTRES D'IMAGERIE

L'objectif de l'étape d'étalonnage est de s'assurer que le matériel d'imagerie fonctionne avec les paramètres adéquats pour l'essai REACTIV. 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 d'EE2 de 488 ng/L.

2) Application de ces paramètres à l'analyse quantitative lors de trois épreuves d'une expérience de concentration-réponse avec six concentrations d'EE2 ainsi qu'avec les autres témoins de l'essai (T, T + EE2 et T + fadrozole) afin de vérifier l'amplitude de l'induction et la sensibilité aux produits avec des concentrations croissantes de T et de s'assurer que les autres témoins de l'essai produisent 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. Il ne s'agit là que d'un exemple, et la même procédure peut être réalisée à l'aide d'un autre solvant. Il n'est pas nécessaire de renouveler la procédure d'étalonnage en cas de changement de solvant lors de la mise en œuvre de l'essai REACTIV, ni 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. Pour choisir les paramètres d'acquisition d'images, on expose 40 éléuthéroembryons à 488 µg/L d'EE2 et on ajuste les paramètres comme indiqué dans le protocole suivant. Cette étape ne requiert qu'un seul réplicat.

- Préparation du milieu d'exposition
 - Le groupe témoin se compose de 5 puits, contenant chacun 8 éléuthéroembryons de la lignée *chgh-gfp*.
 - La concentration finale de DMSO s'élève à 0.2 % dans tous les puits.
 - Préparer une solution de 488 µg/L d'EE2 dans du DMSO.
 - Préparer des aliquotes de 200 µL de la solution de 488 µg/L d'EE2.
 - Conserver les aliquotes à -20 °C pendant 6 mois au maximum.
 - Préparer la solution d'exposition suivante de 488 ng/L d'EE2 contenant 0.2 % de DMSO.

Milieu d'essai	49,9 mL
EE2 à 488 µg/L dans DMSO	50 µL
DMSO	50 µL

- Début de l'exposition
 - Ajouter 8 éléuthéroembryons transgéniques *chgh-gfp* sélectionnés au hasard et placés dans chaque puits dans de gouttes de milieu d'essai.

- 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, avec un cycle de 14 heures de lumière et de 10 heures d'obscurité. Ne pas nourrir les éléuthéroembryons pendant l'essai.
- Rinçage des éléuthéroembryons à 24 h
 - Préparer des plaques 6 puits pour le rinçage, contenant 8 mL d'eau permettant une croissance et un développement normaux chez *O. latipes* (voir §29) 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 24 h
 - Si nécessaire, anesthésier les éléuthéroembryons exposés à 488 ng/L d'EE2 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 ventrale 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 du foie entier.
 - Vérifier les autres éléuthéroembryons sur la plaque pour s'assurer que le foie entier est visible sur une seule 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 le foie soit aussi lumineux que possible sans apparaître blanc.
 - 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 du foie. 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 §49 au §55.

- Des exemples d'images d'éléuthéroembryons après exposition à un œstrogène (vue ventrale) sont présentés ci-après (Annexe 7).

2- Détermination de la linéarité et de la sensibilité à l'EE2

La seconde étape consiste à déterminer la linéarité et la sensibilité à l'EE2. À cette fin, on expose des groupes de 8 éléuthéroembryons à une série de concentrations d'EE2. Cette étape requiert trois épreuves indépendantes.

- Préparation du milieu d'exposition
 - Chaque groupe témoin se compose de 1 puits, chaque puits contenant 8 éléuthéroembryons de la lignée *chgh-gfp*.
 - La concentration finale de DMSO s'élève à 0.2 % dans tous les puits.
 - Préparer une solution de 488 µg/L d'EE2 dans du DMSO.
 - Préparer des aliquotes de 200 µL de la solution de 488 µg/L d'EE2.
 - Conserver les aliquotes à -20 °C pendant 6 mois au maximum.
 - Préparer une solution mère de 30 mg/L de T dans du DMSO.
 - Préparer des aliquotes de 300 µL de la solution de 30 mg/L de T.
 - Conserver les aliquotes à -20 °C pendant 3 mois au maximum.
 - Préparer une solution mère de 10 mg/L de fadrozole dans du DMSO.
 - Préparer des aliquotes de 300 µL de la solution de 30 mg/L de T.
 - Conserver les aliquotes à -20 °C pendant 12 mois au maximum.
 - Préparer les solutions d'essai conformément au Tableau 4.

Les groupes d'essai sont les suivants.

Témoin solvant : milieu d'essai ; 0.2 % de DMSO
EE2 à 34 ng/L ; 0.2 % de DMSO
EE2 à 51 ng/L ; 0.2 % de DMSO
EE2 à 76 ng/L ; 0.2 % de DMSO
EE2 à 114 ng/L ; 0.2 % de DMSO
EE2 à 171 ng/L ; 0.2 % de DMSO
EE2 à 488 ng/L ; 0.2 % de DMSO
T à 30 µg/L ; 0.2 % de DMSO
T à 30 µg/L+ EE2 à 64 ng/L ; 0.2 % de DMSO
T à 30 µg/L ; + fadrozole à 10 µg/L ; 0.2 % de DMSO

Tableau 4. Préparation des solutions d'essai et solutions intermédiaires (fond gris).

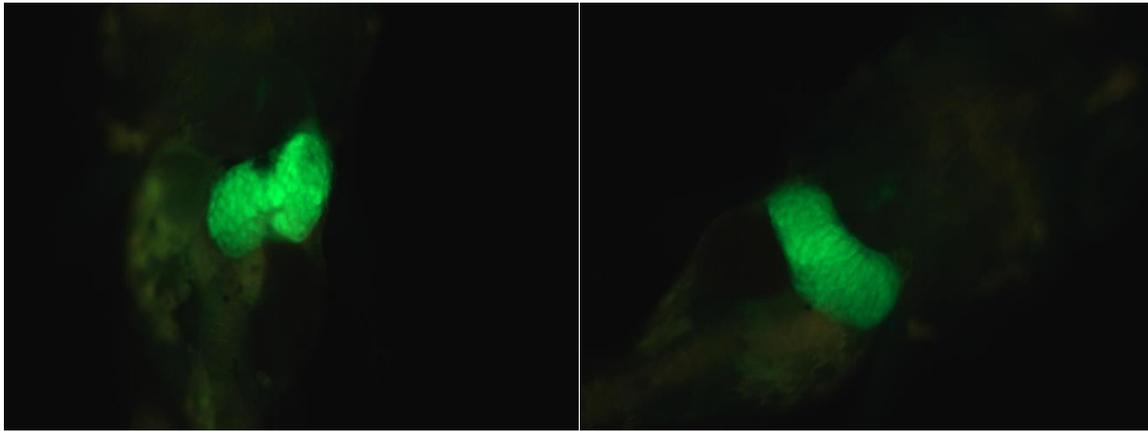
Nom de la solution	Volume intermédiaire à préparer (mL)	Solutions à mélanger	Volume final (mL)
Milieu d'essai ; 0.1 % de DMSO	120	119.88 mL de milieu d'essai + 120 µL de DMSO	20
Témoin solvant	70	69.93 mL de milieu d'essai ; 0.1 % de DMSO + 70 µL de DMSO	12
T à 30 µg/L ; 0.1 % de DMSO	50	49.95 mL de milieu d'essai + 50 µL de T à 30 mg/L	10
T à 30 µg/L ; 0.2 % de DMSO	20	19.98 mL de T à 30 µg/L ; 0.1 % de DMSO + 20 µL de DMSO	20
EE2 à 488 ng/L	30	29.07 mL de milieu d'essai ; 0.1 % de DMSO + 30 µL d'EE2 à 488 µg/L	16,1
EE2 à 171 ng/L	17	5.96 mL d'EE2 à 488 ng/L + 11.04 mL de témoin solvant	17
EE2 à 114 ng/L	17	3.97 mL d'EE2 à 488 ng/L + 13.03 mL de témoin solvant	17
EE2 à 76 ng/L	13	1.87 mL d'EE2 à 488 ng/L + 11.13 mL de témoin solvant	13
EE2 à 51 ng/L	10	1.05 mL d'EE2 à 488 ng/L + 8.95 mL de témoin solvant	10
EE2 à 34 ng/L	15	1.05 mL d'EE2 à 488 ng/L + 13.95 mL de témoin solvant	15
T à 30 µg/L + EE2 à 64 ng/L	10	9.99 mL de T à 30 µg/L ; 0.1 % de DMSO + 10 µL d'EE2 à 64 µg/L	10
T à 30 µg/L + fadrozole à 10 µg/L	10	9.99 mL de T à 30 µg/L ; 0.1 % de DMSO + 10 µL de fadrozole à 10 mg/L	10

- Début de l'exposition
 - Ajouter 8 éléuthéroembryons transgéniques *chgh-gfp* dans chaque puits.
 - Retirer le plus possible de liquide sans dessécher les éléuthéroembryons (volume maximal restant : 800 µL).
 - Procéder au traitement du témoin solvant, puis des groupes EE2 et enfin des autres témoins dans l'ordre suivant : T, T + EE2 et T + fadrozole.
 - Remplir chaque puits avec 8 mL de chaque préparation.
 - Incuber les plaques à 26 °C, avec un cycle de 14 heures de lumière et de 10 heures d'obscurité. Ne pas nourrir les éléuthéroembryons pendant l'essai.
 -
- Rinçage des éléuthéroembryons à 24 h

- Préparer des plaques 6 puits pour le rinçage, contenant 8 mL d'eau permettant une croissance et un développement normaux chez *O. latipes* (voir §29) 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 24 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 une surface en plastique noir ou des plaques noires 96 puits.
 - Placer les éléuthéroembryons de façon à permettre une imagerie de la face ventrale 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 §49 au §55.
- Interprétation des résultats
 - Après analyse statistique et représentation graphique de l'ensemble des données réunies, noter la concentration minimale avec effet observé (CMEO) pour l'EE2.
 - La CMEO doit être d'au moins 114 ng/L pour l'EE2 et les témoins T, T + EE2 et T + fadrozole doivent présenter une différence statistiquement significative par rapport aux témoins correspondants.
 - Les témoins EE2 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 l'améliorer.
 - Si des valeurs zéro sont présentes dans les données brutes pour les mesures de fluorescence du témoin solvant ou du témoin milieu d'essai, on s'efforcera d'ajuster les paramètres d'acquisition d'images pour s'assurer que tous les éléuthéroembryons du groupe témoin négatif donnent des valeurs supérieures à zéro.

ANNEXE 7. POSITIONNEMENT DES ÉLEUTHÉROEMBRYONS

Le Graphique 4 ci-dessous illustre la façon dont les éleuthéroembryons doivent être positionnés pour l'imagerie. Le positionnement des éleuthéroembryons est considéré comme correct s'il permet une imagerie de la région ventrale incluant la zone où se trouve le foie.



Graphique 4. A et B) Vues ventrales de deux éleuthéroembryons de médaka *chgh-gfp* présentant un signal GFP dans le foie. A) La tête de l'éleuthéroembryon est partiellement hors champ en haut de l'image. B) La tête de l'éleuthéroembryon est partiellement hors champ en haut à droite de l'image.

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

Méthode 1

L'approche statistique recommandée (voir Graphique 5), 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).

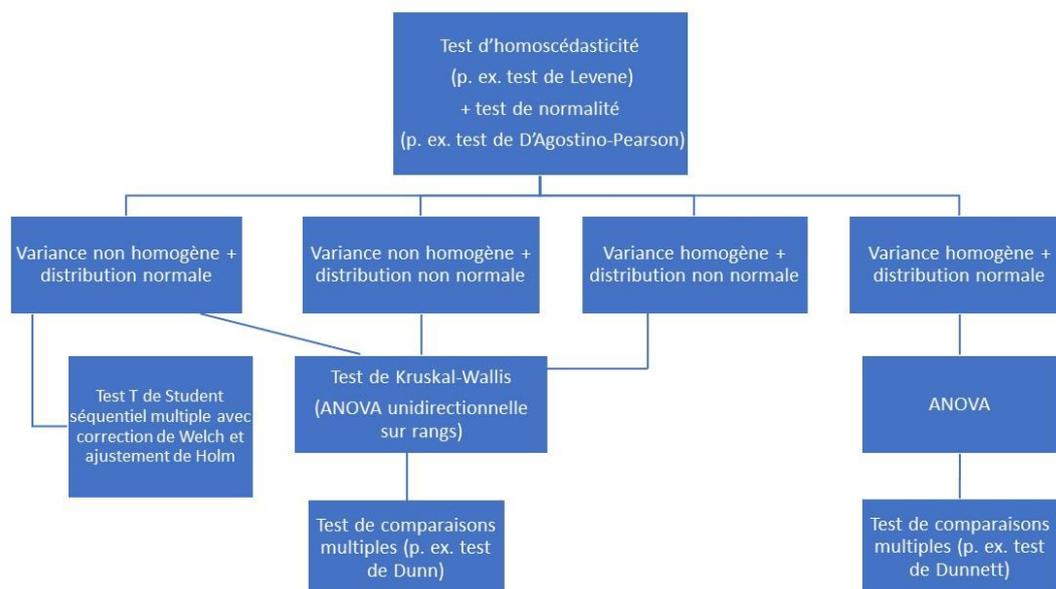
Si les données sont distribuées normalement et que l'hypothèse d'homogénéité de la variance est vérifiée, on réalise une analyse de la variance (ANOVA) pour les groupes de produits chimiques d'essai sans ajouts dosés (mode non enrichi) et le témoin négatif (témoin solvant ou témoin milieu d'essai selon 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 T 30 µg/L, suivie d'un test de Dunnett.

Si les données suivent une distribution normale, mais que l'hypothèse d'homogénéité de la variance n'est pas vérifiée, on procède à 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 comparaisons multiples de Dunn ou de Welch. 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 T 30 µg/L, 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 T 30 µg/L, suivi d'un test de Dunn.

Si uniquement deux groupes sont à comparer, par exemple le témoin T de 30µg/L et le témoin T de 30µg/L + le témoin 64ng/L EE2, il faut au préalable déterminer si les données de chaque groupe traité sont normalement distribuées, un test T de Student corrigé par Welch devra être effectué. Si les données de l'un ou les deux groupes traité(s) ne suivent pas une distribution normale, un test de Mann-Whitney devra être effectué.

Les différences entre les valeurs de fluorescence moyenne sont considérées comme statistiquement significatives si $P < 0.01$ (ce qui est généralement dénoté par **).



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

Méthode 2

Il est également possible d'utiliser une approche ANOVA mixte/hiérarchique pour réaliser l'analyse statistique des données. Le cas échéant, il est vivement conseillé de procéder à une inspection visuelle des données à chaque épreuve.

Cette approche statistique s'appuie sur un modèle ANOVA mixte/hiérarchique présentant la structure suivante :

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

où y_{ijk} est la fluorescence mesurée de l'échantillon k dans l'épreuve i traitée avec la concentration j . Le modèle comporte un seul facteur fixe (traitement, α_i) et deux facteurs aléatoires (l'épreuve β_j et l'interaction épreuve-traitement β_{ij}). ϵ_{ijk} décrit le terme d'erreur du modèle.

Cette approche est comparable à celle recommandée à l'Annexe 13 de la LD 248 de l'OCDE portant sur l'essai XETA, qui s'appuie sur un dispositif expérimental similaire, dans lequel les traitements sont imbriqués dans les épreuves, ce qui donne des composantes de variance pour l'épreuve et pour l'épreuve par traitement. Ce dispositif est différent des plans expérimentaux d'écotoxicité utilisés dans la plupart des lignes directrices de l'OCDE, dans lesquels les réplicats sont imbriqués au sein de chaque dose de traitement. Si l'on analyse les données de l'essai REACTIV en traitant les réplicats/épreuves de façon incorrecte, comme imbriqués au sein du traitement, cela a un impact considérable sur la puissance statistique des essais (OCDE, 2019c, Annexe 3).

Si l'on utilise le logiciel R pour analyser les données de l'étude, le modèle ANOVA mixte peut être construit avec le package lme4 de R (Bates *et al.*, 2015) :

```
lme4::lmer(Fluorescence ~ Treatment + (1|Run) + (1|Run:Treatment), REML=TRUE)
```

Il est également possible de traiter l'épreuve comme un effet fixe plutôt que comme un effet aléatoire, ce qui permet l'analyse par épreuve. Cependant, l'analyse doit principalement viser à déterminer l'effet du traitement sur la population. Or les analyses par épreuve ne fournissent pas d'informations objectives à cet égard.

Par défaut, les estimations relatives au groupe de traitement issues du modèle ANOVA mixte doivent être comparées à la réponse du groupe témoin, en utilisant le test de Dunnett par paires au niveau alpha de 0.05. Un test bilatéral devra être réalisé, à moins qu'il ne soit scientifiquement justifié de n'attendre de changement que dans une direction.

Si et uniquement si on décèle une augmentation ou une diminution clairement monotone de la relation traitement-réponse, on pourra effectuer un test de Williams. Par conséquent, l'erreur-type propre à chaque différence de moyenne entre chaque groupe de traitement et chaque groupe témoin est tirée du tableau des résultats du test de Dunnett. Ces erreurs-types et les degrés de liberté regroupés (p. ex. les dfs de Kenward-Rogers) sont utilisés dans un test de Williams par ailleurs standard (Green *et al.*, 2018 ; OCDE, 2006 ; OCDE, 2019, Annexe 13d). Dans les cas où une relation dose-réponse clairement croissante ou décroissante est décelée, on sait déjà dans quelle direction l'effet doit être testé (au niveau alpha de 0.05). Cette recommandation s'écarte de l'affirmation selon laquelle un test de tendance doit être effectué unilatéralement dans chaque direction au niveau alpha de 0.025, lorsque la direction du test n'est pas claire (OCDE, 2006). Toutefois, elle est fondée sur des considérations pratiques, car la valeur alpha du test de Williams classique ne peut souvent pas être ajustée à une valeur autre que 0.05 (Green *et al.*, 2018).

Les écarts par rapport à la monotonie peuvent être identifiés en réalisant une inspection visuelle, en détectant des problèmes liés à l'algorithme PAVA du test de Williams (p. ex. lorsque la majorité des moyennes de traitement sont amalgamées) et/ou en effectuant un test de monotonie (Green *et al.*, 2018 ; OCDE, 2006). Lorsque l'on effectue un test de monotonie, il est recommandé de supposer la monotonie uniquement quand le contraste linéaire est significatif.

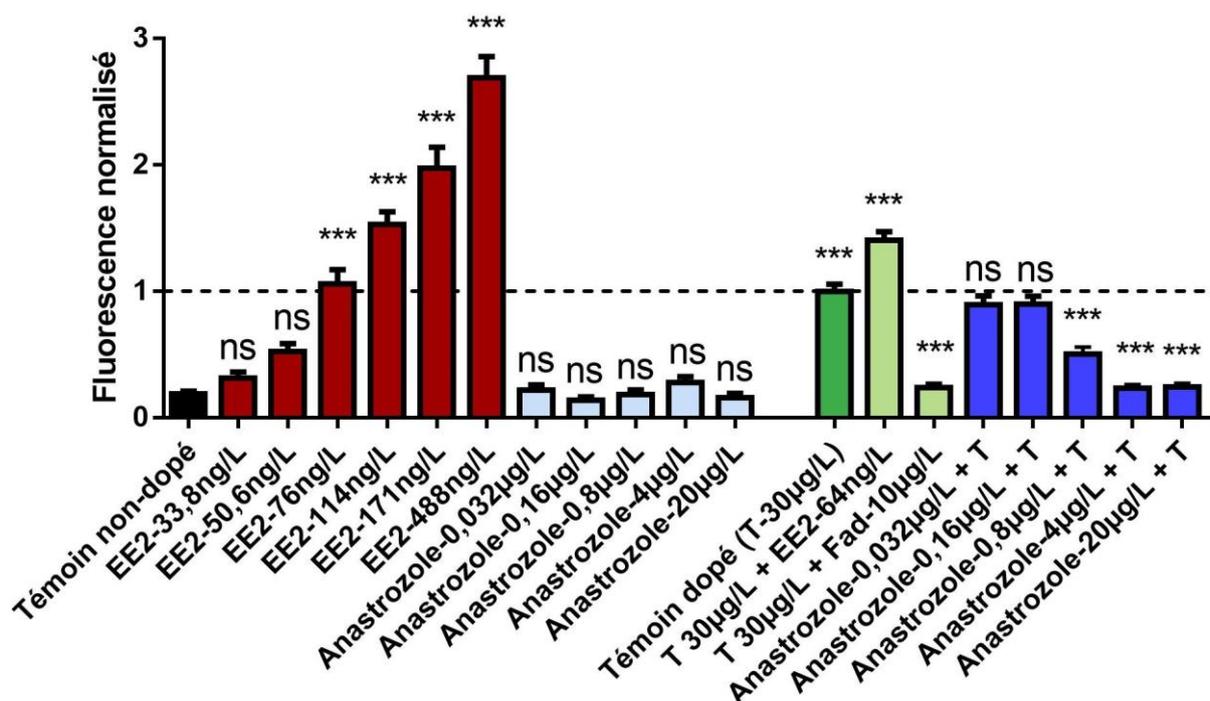
Lorsque l'on recourt à des pré-tests pour tester la normalité et l'homogénéité de la variance entre les groupes de traitement, il convient de le faire avec les résidus du modèle ANOVA mixte. La normalité peut être évaluée à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk, et l'homogénéité de la variance à l'aide d'un test de Levene, par exemple. La valeur alpha doit être de 0.01. Il est recommandé d'examiner visuellement les diagrammes résiduels et les diagrammes quantile-quantile. En cas d'écarts par rapport à la normalité et à l'homogénéité de la variance, il est possible d'éliminer les valeurs aberrantes, par exemple en appliquant la règle de Tukey (Green *et al.*, 2018), et de transformer les données, par exemple au format logarithme ou racine carrée.

L'approche ANOVA présente l'avantage de tenir compte de la variabilité de l'interaction entre épreuve et traitement, contrairement à la méthode 1. En prenant correctement en compte cette source de variabilité, le modèle ANOVA mixte peut permettre des déductions plus précises concernant les effets du traitement sur la fluorescence mesurée.

ANNEXE 9. COURBES CONCENTRATION-RÉPONSE TYPIQUES ET LEUR INTERPRÉTATION

Pour faciliter l'interprétation de l'essai REACTIV, 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.

Anastrozole



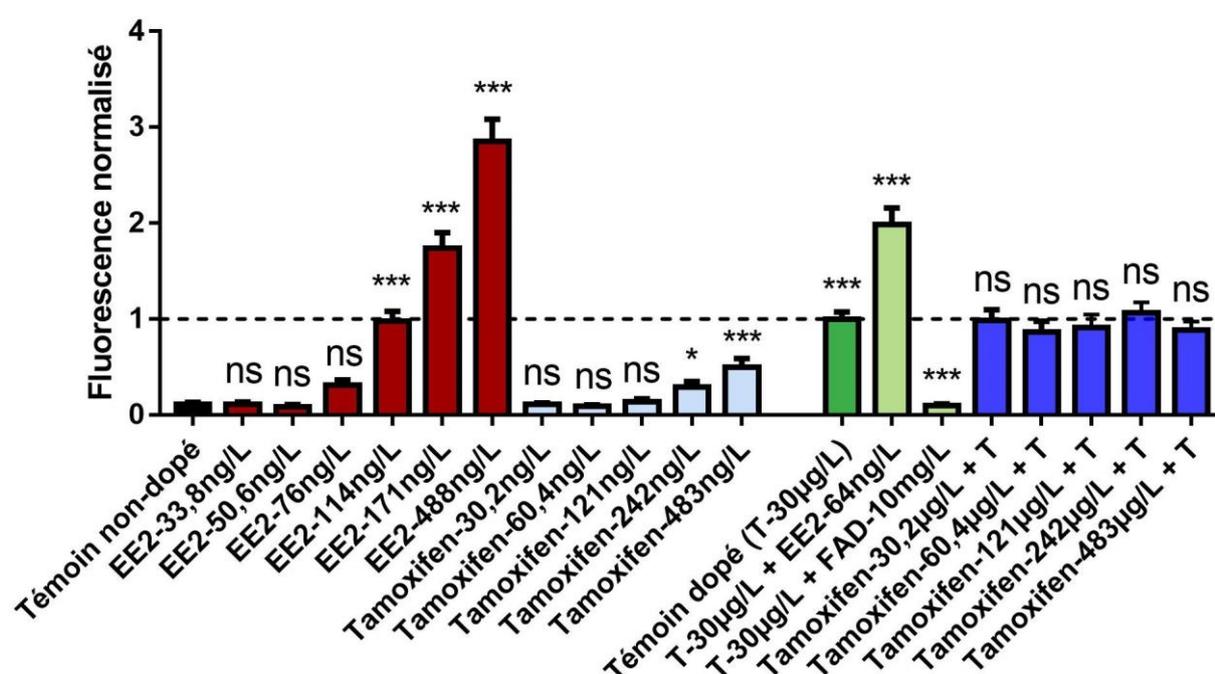
Graphique 6. Exemple de résultat obtenu avec l'anastrozole lors de l'étude de validation de l'OCDE. La fluorescence a été normalisée à la valeur de fluorescence moyenne du témoin T 30 µg/L. La signification statistique est représentée par * pour $p < 0.05$, ** pour $p < 0.01$, *** pour $p < 0.001$ et ns (non significatif) pour $p > 0.05$. Les variations de la fluorescence sont réputées significatives à $p < 0.01$.

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 REACTIV. La fluorescence moyenne normalisée du témoin EE2 488 ng/L et des groupes témoins avec ajouts dosés (mode enrichi) présente une différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin avec ajouts dosés (mode non enrichi), qui est d'au moins $P < 0.01$. De la même manière, les groupes témoins T + EE2 et T + fadrozole présentent une différence

statistiquement significative par rapport au groupe témoin avec ajouts dosés (mode enrichi), qui est d'au moins $P < 0.01$.

La fluorescence moyenne normalisée d'au moins une concentration d'anastrozole avec ajouts dosés (mode enrichi) (barres bleu foncé) présente une différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin avec ajouts dosés (mode enrichi) (barre vert foncé) et une relation concentration-réponse monotone est observée. On en conclut donc que l'anastrozole est actif dans l'essai REACTIV.

Tamoxifène

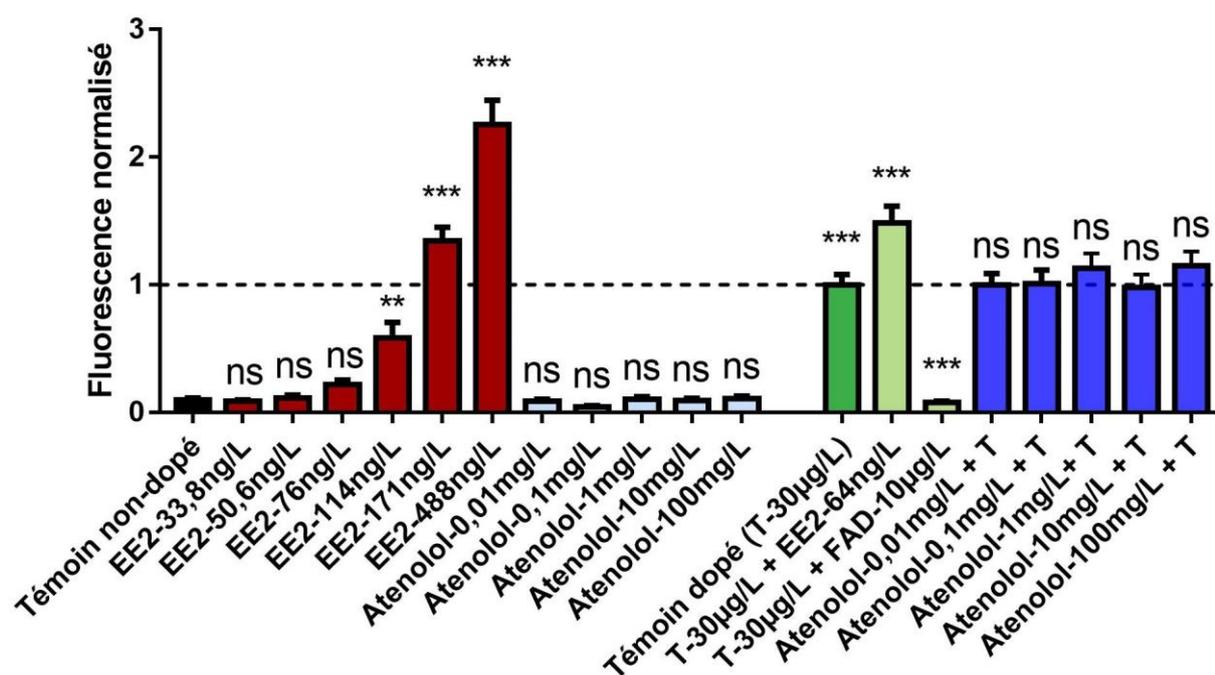


Graphique 7. Exemple de résultat obtenu avec le tamoxifène lors de l'étude de validation de l'OCDE. La fluorescence a été normalisée à la valeur de fluorescence moyenne du témoin T 30 µg/L. La signification statistique est représentée par * pour $p < 0.05$, ** pour $p < 0.01$, *** pour $p < 0.001$ et ns (non significatif) pour $p > 0.05$. Les variations de la fluorescence sont réputées significatives à $p < 0.01$.

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 REACTIV. La fluorescence moyenne normalisée du témoin EE2 488 ng/L et des groupes témoins avec ajouts dosés (mode enrichi) présente une différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin avec ajouts dosés (mode non enrichi), qui est d'au moins $P < 0.01$. De la même manière, les groupes témoins T + EE2 et T + fadrozole présentent une différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin avec ajouts dosés (mode enrichi), qui est d'au moins $P < 0.01$.

La fluorescence moyenne normalisée d'au moins une concentration de tamoxifène sans ajouts dosés (mode non enrichi) (barres bleu clair) présente une différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin sans ajouts dosés (mode non enrichi) (barre noire) et une relation concentration-réponse monotone est observée. On en conclut donc que le tamoxifène est actif dans l'essai REACTIV.

Aténolol



Graphique 8. Exemple de résultat obtenu avec l'aténolol lors de l'étude de validation de l'OCDE. La fluorescence a été normalisée à la valeur de fluorescence moyenne du témoin T 30 µg/L. La signification statistique est représentée par * pour $p < 0.05$, ** pour $p < 0.01$, * pour $p < 0.001$ et ns (non significatif) pour $p > 0.05$. Les variations de la fluorescence sont réputées significatives à $p < 0.01$.**

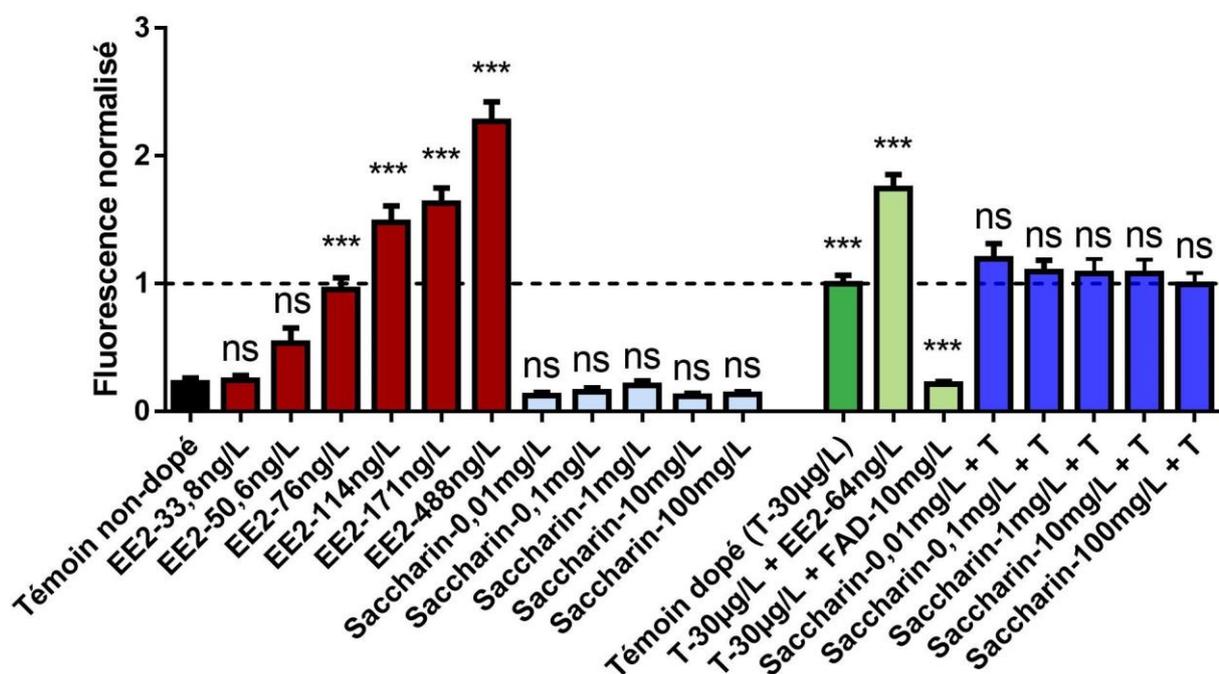
Les épreuves individuelles avaient déjà rempli les critères de validité. Le Graphique 8 montre que tous les critères de validité applicables aux témoins dans l'ensemble des données réunies ont été remplis par le laboratoire réalisant cet essai REACTIV. La fluorescence moyenne normalisée du témoin EE2 488 ng/L et des groupes témoins avec ajouts dosés (mode enrichi) présente une différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin avec ajouts dosés (mode non enrichi), qui est d'au moins $P < 0.01$. De la même manière, les groupes témoins T + EE2 et T + fadrozole présentent une différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin avec ajouts dosés (mode enrichi), qui est d'au moins $P < 0.01$.

Aucune des concentrations d'essai d'aténolol sans ajouts dosés (mode non enrichi) (barres bleu clair) ne fait ressortir de différence statistiquement significative de la fluorescence moyenne normalisée par rapport au groupe témoin sans ajouts dosés (mode non enrichi) (barre noire).

Aucune des concentrations d'essai d'aténolol avec ajouts dosés (mode enrichi) (barres bleu foncé) ne fait ressortir de différence statistiquement significative de la fluorescence moyenne normalisée par rapport au groupe témoin avec ajouts dosés (mode enrichi) (barre vert foncé).

On en conclut donc que l'aténolol est inactif dans l'essai REACTIV.

Saccharine



Graphique 9. Exemple de résultat obtenu avec la saccharine lors de l'étude de validation de l'OCDE. La fluorescence a été normalisée à la valeur de fluorescence moyenne du témoin T 30 µg/L. La signification statistique est représentée par * pour $p < 0.05$, ** pour $p < 0.01$, *** pour $p < 0.001$ et ns (non significatif) pour $p > 0.05$. Les variations de la fluorescence sont réputées significatives à $p < 0.01$.

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 REACTIV. La fluorescence moyenne normalisée du témoin EE2 488 ng/L et des groupes témoins avec ajouts dosés (mode enrichi) présente une différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin avec ajouts dosés (mode non enrichi), qui est d'au moins $P < 0.01$. De la même manière, les groupes témoins T + EE2 et T + fadrozole présentent une différence

statistiquement significative par rapport au groupe témoin avec ajouts dosés (mode enrichi), qui est d'au moins $P < 0.01$.

Aucune des concentrations d'essai de saccharine sans ajouts dosés (mode non enrichi) (barres bleu clair) ne fait ressortir de différence statistiquement significative de la fluorescence moyenne normalisée par comparaison avec le groupe témoin sans ajouts dosés (mode non enrichi) (barre noire).

Aucune des concentrations d'essai de saccharine avec ajouts dosés (mode enrichi) (barres bleu foncé) ne fait ressortir de différence statistiquement significative de la fluorescence moyenne normalisée par rapport au groupe témoin avec ajouts dosés (mode enrichi) (barre vert foncé).

On en conclut donc que la saccharine est inactive dans l'essai REACTIV.

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

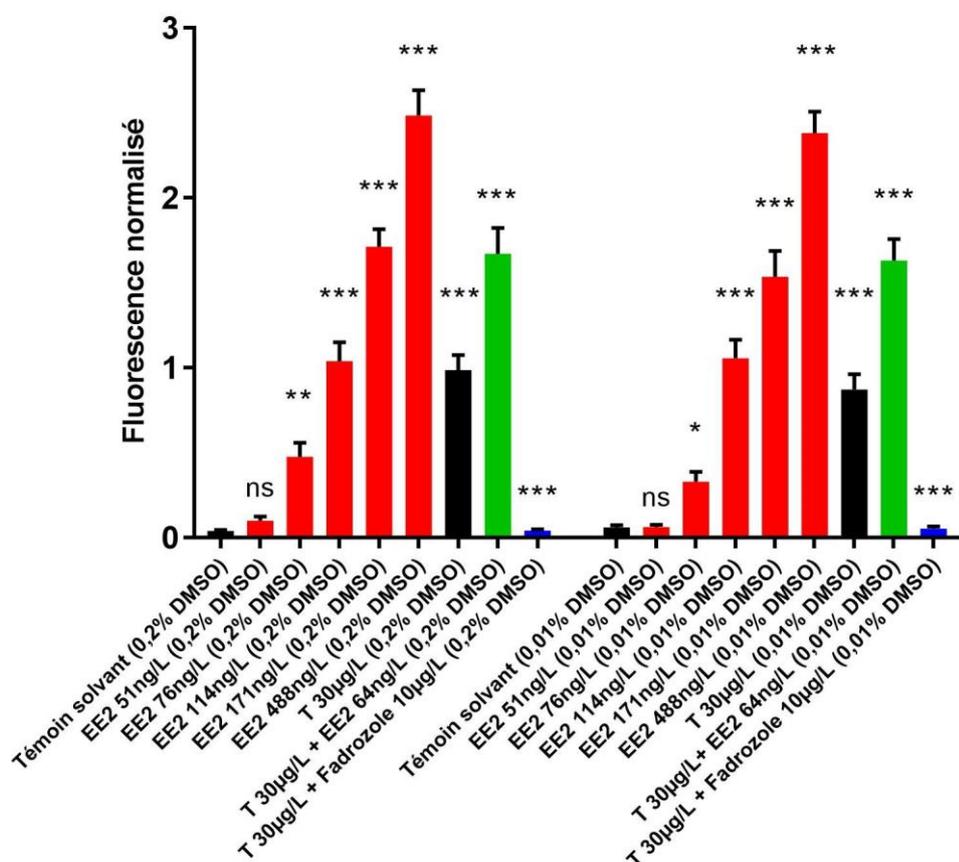
Concernant la lignée de médaka japonais transgénique *chgh-gfp*, l'accès est assuré dans les pays membres de l'OCDE et les pays adhérents à l'Acceptation mutuelle des données (AMD), à travers WatchFrog et les laboratoires partenaires. Il est envisagé que ces laboratoires partenaires forment un réseau de distribution, comprenant notamment les laboratoires ayant pris part à l'essai circulaire de validation, ainsi que des collections telles que TEFOR (France), le National BioResource Project (Japon) et le Muséum national d'Histoire naturelle (France), comme pour l'essai XETA (OCDE, LD 248) et l'essai RADAR (OCDE, LD 251) Dans le cadre d'un réseau similaire, les organismes de recherche contractuels pour les essais XETA et REACTIV auront la possibilité de distribuer l'essai indépendamment du développeur de la méthode.

L'accès à la lignée *chgh-gfp* nécessite un accord de licence. Le développeur de la méthode a déjà signé un document juridique l'engageant à se conformer aux principes *Fair, Reasonable And Non-Discriminatory* (FRAND) de l'OCDE 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'essais *in vitro*.

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

ANNEXE 11. PERFORMANCE DU GROUPE TÉMOIN CONTENANT 0.01% DMSO

Une expérience est effectuée afin de s'assurer de la performance des groupes témoins quand l'essai est effectué avec 0.01% de DMSO plutôt que 0.02% de DMSO qui a été utilisé dans la validation inter-laboratoire. Un essai REACTIV complet comprenant trois épreuves expérimentales a été effectué avec uniquement des groupes témoins, y compris les groupes témoins obligatoires et optionnels. L'essai a été effectué en parallèle avec 0.02% et 0.01% de DMSO avec le même lot d'éléuthéroembryons utilisé pour les deux concentrations de solvant. Chacune des trois épreuves a été effectuée avec un lot différent d'éléuthéroembryons à des jours différents et avec des solutions d'essai fraîchement préparées. Les résultats sont montrés sur le graphique 10, qui montre clairement que la performance dans les témoins est nominale et très similaire que 0.02% ou 0.01% de DMSO soit utilisé.



Graphique 10. Comparaison des groupes témoins évalués en présence de 0.02% ou 0.01% de DMSO. La fluorescence a été normalisée par rapport à la valeur moyenne du témoin à 0.02% de DMSO enrichi en T à 30µg/L. Le seuil de signification statistique est montré comme : * : p,0.05 ; ** : p<0.01 ; *** : p<0.001 ; ns : p>0.05. Les changements de fluorescence sont considérés comme significatif à p<0.01.

Les critères de validité ont déjà été satisfaits pour chaque épreuve individuelle. Le graphique 10 montre que tous les critères de validité liés à la performance des témoins dans les données regroupées ont été satisfaits pour les deux concentrations de solvant. La moyenne normalisé de

fluorescence des groupes témoins enrichis par 488ng/L EE2 et de T étaient statistiquement significativement différents par rapport aux groupes témoins non enrichis (témoins solvant) d'au moins $p < 0.01$. De même, les groupes témoins T+EE2 et T+fadrozole étaient statistiquement significativement différents par rapport aux groupe témoins enrichi en T d'au moins $p < 0.01$.