



Section 4
Effets sur la santé

Ligne directrice n° 455

Ligne directrice axée sur la performance
pour les essais *in vitro* de transactivation
par transfection stable visant la
détection des substances agonistes
et antagonistes des récepteurs
des œstrogènes

14 juin 2021

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



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

Ligne directrice axée sur la performance pour les essais *in vitro* de transactivation par transfection stable visant la détection des substances agonistes et antagonistes des récepteurs des œstrogènes

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Ligne directrice pour les essais axée sur la performance

1. La présente Ligne directrice pour les essais axée sur la performance (LDAP) décrit la méthodologie des essais *in vitro* de transactivation par transfection stable visant la détection des substances agonistes et antagonistes des récepteurs des œstrogènes (essais de TA ER). Elle comprend plusieurs méthodes d'essai structurellement et fonctionnellement similaires pour détecter les substances agonistes et antagonistes des récepteurs des œstrogènes (ER α et/ou ER β), et devrait faciliter le développement de nouvelles méthodes similaires ou modifiées, conformément aux principes de validation exposés dans le document d'orientation de l'OCDE intitulé « Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment » (1). Les méthodes d'essai suivantes de TA ER de référence, entièrement validées, (annexes 2 et 3) constituent la base de la présente LDAP :

- Essai de TA par transfection stable (essai STTA) faisant appel à la lignée cellulaire hER α -HeLa-9903 (2) ; et
- Essai de TA ER VM7Luc (3) faisant appel à la lignée cellulaire VM7Luc-4E2¹ qui exprime principalement hER α , et pour partie hER β (4) (5).

Des normes de performance (6) (7) sont disponibles pour l'élaboration et la validation de méthodes d'essai

¹ Avant juin 2016, cette lignée cellulaire était désignée lignée cellulaire BG1Luc. Les cellules BG-1 ont été décrites à l'origine par Geisinger et al. (1998) (35) et ont été ultérieurement caractérisées par les chercheurs du National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). Relativement récemment, on a découvert qu'il existe en fait deux variants différents des cellules BG-1 utilisées par les chercheurs, BG-1 Fr et BG-1 NIEHS. Une analyse approfondie, incluant des tests sur l'ADN, de ces deux lignées cellulaires BG-1 menée par Li et al (2014) (37) a montré que BG-1 Fr était unique et que BG-1 NIEHS, c'est à dire la lignée cellulaire d'origine utilisée pour le développement de l'essai n'était pas la lignée cellulaire d'adénocarcinome ovarien d'origine humaine, mais était en fait un variant de la lignée cellulaire MCF7 de cancer du sein d'origine humaine. La lignée cellulaire utilisée dans l'essai, citée à l'origine comme étant BG1Luc4E2 (38), est maintenant désignée VM7Luc4E2 ("V" = variant; "M7" = cellules MCF7). De même, l'essai est maintenant désigné VM7Luc ER TA. Alors que cela modifie l'origine de la lignée cellulaire sur laquelle l'essai est basé, cela n'affecte pas les études de validation publiées ni l'utilité et l'application de cet essai pour le dépistage des produits chimiques oestrogéniques et anti-oestrogéniques.

similaires visant le même danger/effet, et seront utilisées pour permettre l'inclusion de ces méthodes en temps opportun dans la LDAP. Toutefois, l'ajout de nouvelles méthodes d'essai similaires à celles de la LDAP ne sera possible qu'après examen et approbation eu égard au respect des normes de performance. Les méthodes d'essai incluses dans la présente Ligne directrice peuvent être utilisées, sans discrimination, pour répondre aux exigences nationales en matière d'essai de TA ER dans le cadre du système d'Acceptation mutuelle de données.

Rappel des faits et principes relatifs aux méthodes d'essai incluses dans la présente LDAP

2. L'OCDE a lancé en 1998 une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les Lignes directrices existantes ou à établir de nouvelles Lignes directrices concernant le dépistage et les essais de substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien. Le Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (CC) a été révisé en 2012. Les versions originale et révisée de ce CC figurent en tant qu'annexes dans le document d'orientation sur les Lignes directrices normalisées pour évaluer l'effet perturbateur des produits chimiques sur le système endocrinien (8). Le CC comprend cinq niveaux, chacun d'entre eux correspondant à un degré différent de complexité biologique. Les essais de TA ER décrits dans cette LDAP correspondent au niveau 2, qui couvre « *les essais in vitro fournissant des données sur certains mécanisme(s) et voie(s) d'activité endocrinienne* ». La présente LDAP concerne les méthodes d'essai *in vitro* de transactivation (TA) conçues pour la détection des substances agonistes et antagonistes des récepteurs des œstrogènes (ER).

3. L'interaction des œstrogènes et des récepteurs des œstrogènes (ER) peut affecter la transcription des gènes régulés par les œstrogènes, ce qui est susceptible d'entraîner l'induction ou l'inhibition de processus cellulaires, notamment les mécanismes nécessaires à la prolifération cellulaire, au développement normal du fœtus et aux fonctions reproductives (9) (10) (11). La perturbation des systèmes œstrogéniques normaux pourrait déclencher des troubles du développement (ontogénèse) et nuire à la santé génésique et à l'intégrité du système reproductif.

4. Les essais *in vitro* de TA sont fondés sur une interaction directe ou indirecte entre les substances chimiques et un récepteur spécifique qui régule la transcription du produit d'un gène rapporteur. Ces essais sont largement utilisés pour évaluer l'expression génique régulée par des récepteurs nucléaires particuliers, comme les ER (12) (13) (14) (15) (16). Ils sont proposés pour détecter la transactivation œstrogénique régulée par ER (17) (18) (19). Il existe au moins deux grands sous-types de ER nucléaires, désignés α et β , qui sont encodés par des gènes distincts. Les protéines correspondantes présentent des distributions tissulaires, des affinités de liaison avec les ligands et des fonctions biologiques propres différentes (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Les ER α nucléaires sont les médiateurs de la réponse œstrogénique classique (27) (28) (29) (30), c'est pourquoi la plupart des modèles de mesure de l'activation ou de l'inhibition des ER actuellement en cours de développement sont spécifiques aux ER α . Ces essais servent à détecter les substances chimiques qui activent (ou inhibent) les ER par la liaison du ligand au récepteur. Le complexe récepteur-ligand se fixe ensuite à certains éléments de réponse de l'ADN et transactive ainsi le gène rapporteur, induisant une augmentation de l'expression cellulaire d'un marqueur protéique. Ces méthodes d'essai s'appuient sur diverses réponses des gènes rapporteurs. Dans les systèmes faisant appel à la luciférase, l'enzyme luciférase transforme son substrat, la luciférine, en produit bioluminescent mesurable quantitativement à l'aide d'un luminomètre. Parmi les exemples de marqueurs fréquents figurent aussi une protéine fluorescente, ainsi que le gène *LacZ* qui encode la β -galactosidase, une enzyme qui transforme un substrat incolore, le X-gal (5-bromo-4-chloro-indolylgalactopyranoside) en produit bleu quantifiable au moyen d'un spectrophotomètre. Ces marqueurs peuvent être évalués rapidement et à faible coût à l'aide des nombreux kits d'essai disponibles dans le commerce.

5. Les études de validation des méthodes de STTA et de TA VM7Luc ont démontré la pertinence et la fiabilité de ces essais aux fins prévues (3) (4) (5) (30). Les normes de performance des essais de TA ER fondés sur la luminescence et utilisant des lignées cellulaires de glandes mammaires sont inclus dans le

rapport d'évaluation de l'ICCVAM intitulé « ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL[®] ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals » (3). Ces normes ont été modifiées en vue d'être applicables aux deux méthodes STTA et VM7Luc (2).

6. Les définitions et abréviations utilisées dans cette Ligne directrice pour les essais sont présentées à l'[annexe 1](#).

Portée et limites des essais de transactivation

7. Les présentes méthodes sont proposées à des fins de dépistage et de priorisation, mais elles peuvent aussi livrer des informations sur les mécanismes d'action pouvant être utilisées dans le cadre d'une approche fondée sur le poids de la preuve. Elles s'appuient sur la TA induite par l'établissement d'une liaison chimique avec les ER dans un système *in vitro*. Aussi ne convient-il pas que les résultats obtenus soient directement extrapolés aux mécanismes complexes de signalisation et de régulation qui caractérisent un système endocrinien intact *in vivo*.

8. La TA médiée par les ER est considérée comme l'un des mécanismes clés de la perturbation endocrinienne (PE), bien que d'autres processus aient les mêmes effets, notamment (i) les interactions avec d'autres récepteurs et systèmes enzymatiques du système endocrinien, (ii) la synthèse hormonale (iii) l'activation et/ou l'inactivation métaboliques des hormones, (iv) la distribution hormonale vers les tissus cibles, et (v) l'élimination des hormones de l'organisme. Aucune des méthodes d'essai visées par la présente LDAP ne porte sur ces modes d'action.

9. Cette LDAP porte sur l'aptitude des produits chimiques à activer (activité agoniste) et aussi à inhiber (activité antagoniste) la transcription régulée par les ER. Certains produits chimiques peuvent, selon le type cellulaire utilisé présenter à la fois une activité agoniste et antagoniste, ils sont connus sous la dénomination de modulateurs sélectifs des récepteurs des oestrogènes (MSRE). On peut envisager de soumettre les produits chimiques dont la réponse est négative avec les méthodes d'essai abordées ici à des essais de liaison aux ER, avant de pouvoir conclure qu'ils ne se lient pas aux récepteurs. En outre, l'essai ne livre qu'une indication probable de l'activité de la molécule parente, compte tenu des capacités métaboliques limitées des systèmes cellulaires *in vitro*. Étant donné que l'étude de validation n'a porté que sur des substances isolées, il n'existe aucune information quant à l'applicabilité de l'essai aux mélanges. Cette méthode d'essai est néanmoins théoriquement applicable pour tester des substances multi-constituants et des mélanges. Avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on considérera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats dans cet objectif. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

10. À titre d'information, le [tableau 1](#) fournit les résultats de l'essai agoniste des 34 substances testées avec les deux méthodes de référence entièrement validées décrites dans la présente LDAP. Parmi ces substances, 26 sont définitivement classées comme agonistes des ER et 8 comme négatives d'après les rapports publiés, notamment sur les essais *in vitro* de liaison aux ER et de TA et/ou les essais utéro-trophiques (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). Le tableau 2 fournit les résultats de l'essai antagoniste des 15 substances testées avec les deux méthodes de référence entièrement validées décrites dans la présente LDAP. Parmi ces substances, 4 sont définitivement/probablement classées comme antagonistes des ER et 10 comme négatives d'après les rapports publiés, notamment sur les essais *in vitro* de liaison aux ER et de TA (2) (3) (18) (31). S'agissant des données résumées dans les tableaux 1 et 2, les deux méthodes de référence ont abouti aux mêmes conclusions pour l'ensemble des substances à l'exception de l'une d'elles (Mifepristone) pour l'essai antagoniste, et chaque substance a été classée correctement comme agoniste/antagoniste des ER ou comme négative. D'autres renseignements sur ce groupe de produits

chimiques ainsi que sur les produits chimiques supplémentaires testés dans les essais de STTA et de TA ER VM7Luc dans le cadre des études de validation sont fournis dans les normes de performance pour les essais de TA ER (6) (7), annexe 2 (tableaux 1, 2 et 3).

Tableau 1 : Vue d'ensemble des résultats des essais de STTA et de TA ER VM7Luc obtenus pour les substances testées selon les deux méthodes agonistes et classées comme agonistes des ER (Pos.) ou négatifs (Nég.)

	Substance	N° CAS	Essai STTA ¹			Essai de TA ER VM7Luc ²		Source des données pour la classification ⁴		
			Activité de TA ER	TP ₁₀ (M)	TP ₅₀ ^b (M)	Activité de TA ER	CE ₅₀ ^{b,3} (M)	Autres essais de TA ER ^c	Essais de liaison aux ER	Essais utéro-trophiques
1	17-β-œstradiol ^a	50-28-2	Pos.	< 1.00 × 10 ⁻¹¹	< 1.00 × 10 ⁻¹¹	Pos.	5.63 × 10 ⁻¹²	Pos. (227/227)	Pos.	Pos.
2	17-α œstradiol ^a	57-91-0	Pos.	7.24 × 10 ⁻¹¹	6.44 × 10 ⁻¹⁰	Pos.	1.40 × 10 ⁻⁹	Pos. (11/11)	Pos.	Pos.
3	17-α-éthinyloestradiol ^a	57-63-6	Pos.	< 1.00 × 10 ⁻¹¹	< 1.00 × 10 ⁻¹¹	Pos.	4.20 × 10 ⁻⁸	Pos. (22/22)	Pos.	Pos.
4	17-β-trenbolone	10161-33-8	Pos.	1.78 × 10 ⁻⁸	2.73 × 10 ⁻⁷	Pos.	7.31 × 10 ⁻¹²	Pos. (2/2)	NT	NT
5	19-nortestostérone ^a	434-22-0	Pos.	9.64 × 10 ⁻⁹	2.71 × 10 ⁻⁷	Pos.	1.80 × 10 ⁻⁶	Pos. (4/4)	Pos.	Pos.
6	4-cumylphénol ^a	599-64-4	Pos.	1.49 × 10 ⁻⁷	1.60 × 10 ⁻⁶	Pos.	3.20 × 10 ⁻⁷	Pos. (5/5)	Pos.	NT
7	4-tert-octylphénol ^a	140-66-9	Pos.	1.85 × 10 ⁻⁹	7.37 × 10 ⁻⁸	Pos.	3.19 × 10 ⁻⁸	Pos. (21/24)	Pos.	Pos.
8	Apigénine ^a	520-36-5	Pos.	1.31 × 10 ⁻⁷	5.71 × 10 ⁻⁷	Pos.	1.60 × 10 ⁻⁶	Pos. (26/26)	Pos.	NT
9	Atrazine ^a	1912-24-9	Nég.	-	-	Nég.	-	Nég. (30/30)	Nég.	NT
10	Bisphénol A ^a	80-05-7	Pos.	2.02 × 10 ⁻⁸	2.94 × 10 ⁻⁷	Pos.	5.33 × 10 ⁻⁷	Pos. (65/65)	Pos.	Pos.
11	Bisphénol B ^a	77-40-7	Pos.	2.36 × 10 ⁻⁸	2.11 × 10 ⁻⁷	Pos.	1.95 × 10 ⁻⁷	Pos. (6/6)	Pos.	Pos.
12	Phtalate de butyle et de benzyle ^a	85-68-7	Pos.	1.14 × 10 ⁻⁶	4.11 × 10 ⁻⁶	Pos.	1.98 × 10 ⁻⁶	Pos. (12/14)	Pos.	Nég.
13	Corticostérone ^a	50-22-6	Nég.	-	-	Nég.	-	Nég. (6/6)	Nég.	NT
14	Coumestrol ^a	479-13-0	Pos.	1.23 × 10 ⁻⁹	2.00 × 10 ⁻⁸	Pos.	1.32 × 10 ⁻⁷	Pos. (30/30)	Pos.	NT
15	Daidzéine ^a	486-66-8	Pos.	1.76 × 10 ⁻⁸	1.51 × 10 ⁻⁷	Pos.	7.95 × 10 ⁻⁷	Pos. (39/39)	Pos.	Pos.
16	Diéthylstilbestrol ^a	56-53-1	Pos.	< 1.00 × 10 ⁻¹¹	2.04 × 10 ⁻¹¹	Pos.	3.34 × 10 ⁻¹¹	Pos. (42/42)	Pos.	NT
17	Phtalate de dibutyle	84-74-2	Pos.	4.09 × 10 ⁻⁶		Pos.	4.09 × 10 ⁻⁶	Pos. (6/11)	Pos.	Nég.
18	Éthylparaben	120-47-8	Pos.	5.00 × 10 ⁻⁶	(pas de TP ₅₀)	Pos.	2.48 × 10 ⁻⁵	Pos.		NT
19	Œstrone ^a	53-16-7	Pos.	3.02 × 10 ⁻¹¹	5.88 × 10 ⁻¹⁰	Pos.	2.34 × 10 ⁻¹⁰	Pos. (26/28)	Pos.	Pos.
20	Génistéine ^a	446-72-0	Pos.	2.24 × 10 ⁻⁹	2.45 × 10 ⁻⁸	Pos.	2.71 × 10 ⁻⁷	Pos. (100/102)	Pos.	Pos.
21	Halopéridol	52-86-8	Nég.	-	-	Nég.	-	Nég. (2/2)	Nég.	NT
22	Kaempférol ^a	520-18-3	Pos.	1.36 × 10 ⁻⁷	1.21 × 10 ⁻⁶	Pos.	3.99 × 10 ⁻⁶	Pos. (23/23)	Pos.	NT
23	Képone ^a	143-50-0	Pos.	7.11 × 10 ⁻⁷	7.68 × 10 ⁻⁶	Pos.	4.91 × 10 ⁻⁷	Pos. (14/18)	Pos.	NT
24	Kétoconazole	65277-42-1	Nég.	-	-	Nég.	-	Nég. (2/2)	Nég.	NT
25	Linuron ^a	330-55-2	Nég.	-	-	Nég.	-	Nég. (8/8)	Nég.	NT
26	més0-hexestrol ^a	84-16-2	Pos.	< 1.00 × 10 ⁻¹¹	2.75 × 10 ⁻¹¹	Pos.	1.65 × 10 ⁻¹¹	Pos. (4/4)	Pos.	NT
27	Méthyltestostérone ^a	58-18-4	Pos.	1.73 × 10 ⁻⁷	4.11 × 10 ⁻⁶	Pos.	2.68 × 10 ⁻⁶	Pos. (5/6)	Pos.	NT
28	Morine	480-16-0	Pos.	5.43 × 10 ⁻⁷	4.16 × 10 ⁻⁶	Pos.	2.37 × 10 ⁻⁶	Pos. (2/2)	Pos.	NT
29	Noréthynodrel ^a	68-23-5	Pos.	1.11 × 10 ⁻¹¹	1.50 × 10 ⁻⁹	Pos.	9.39 × 10 ⁻¹⁰	Pos. (5/5)	Pos.	NT
30	p,p'-méthoxychlore ^a	72-43-5	Pos.	1.23 × 10 ⁻⁶	(pas de TP ₅₀) ^b	Pos.	1.92 × 10 ⁻⁶	Pos. (24/27)	Pos.	Pos.

	Substance	N° CAS	Essai STTA ¹			Essai de TA ER VM7Luc ²		Source des données pour la classification ⁴		
			Activité de TA ER	TP ₁₀ (M)	TP ₅₀ ^b (M)	Activité de TA ER	CE ₅₀ ^{b,3} (M)	Autres essais de TA ER ^c	Essais de liaison aux ER	Essais utéro-trophiques
31	Phénobarbital ^a	57-30-7	Nég.	-	-	Nég.	-	Nég. (2/2)	Nég.	NT
32	Résérpine	50-55-5	Nég.	-	-	Nég.	-	Nég. (4/4)	Nég.	NT
33	Spironolactone ^a	52-01-7	Nég.	-	-	Nég.	-	Nég. (4/4)	Nég.	NT
34	Testostérone	58-22-0	Pos.	2.82×10^{-8}	9.78×10^{-6}	Pos.	1.75×10^{-5}	Pos. (5/10)	Pos.	NT

Abréviations : N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service ; M = molaire ; CE₅₀ = concentration efficace de la substance d'essai induisant une réponse égale à la moitié de la réponse maximale ; Nég. = négative ; Pos. = positive ; NT : non testé ; TP₁₀ (et TP₅₀) = concentration de la substance d'essai pour laquelle l'activité est égale à 10 % (ou 50 % pour la TP₅₀) de l'activité maximale induite par le témoin positif (E2 à 1 nM), dans chaque plaque.

^aSubstances courantes soumises aux essais STTA et de TA ER VM7Luc et classées comme agonistes des ER ou négatives, utilisées pour évaluer la précision lors de l'étude de validation de l'essai de TA ER VM7Luc (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, tableau 4-1 [3]).

^bLa concentration d'essai maximale en l'absence de limites dues à la cytotoxicité ou la solubilité s'élevait respectivement à 1×10^{-5} M (STTA) et 1×10^{-3} M (TA ER VM7Luc).

^cLes chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résultats positifs (Pos.) ou négatifs (Nég.) par rapport au nombre total d'études de référence.

¹Valeurs rapportées dans le document Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (2)

²ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL[®] ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3)

³CE₅₀ moyennes calculées à partir des valeurs rapportées par les laboratoires impliqués dans l'étude de validation de la méthode de TA ER VM7Luc (XDS, ECVAM et Hiyoshi) (3).

⁴Les substances sont classées comme agonistes des ER ou négatives d'après les informations des Background Review Documents (BRD) de l'ICCVAM relatifs aux essais de liaison aux ER et de TA ER (31) et les données tirées des publications parues et examinées à la suite des BRD de l'ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Notes: Les méthodes d'essai de cette LDAP n'utilisent pas toutes les mêmes paramètres de mesure. Dans certains cas, la CE₅₀ ne peut pas être calculée car une courbe dose réponse complète ne peut pas être générée. Alors qu'avec la méthode d'essai STTA, la valeur de TP₁₀ est un paramètre de mesure clé, il peut y avoir d'autres exemples où une TP_x donnera des informations utiles.

Tableau 2 : Comparaison des résultats des essais de STTA et de TA ER VM7Luc obtenus pour les substances testées selon les deux méthodes antagonistes et classées comme antagonistes des ER (Pos.) ou négatifs (Neg.)

	Substance ^a	N° CAS	Essai ER STTA ¹		Essai de TA ER VM7Luc ²		ER STTA réponses attendues ⁴	ICCVAM ⁵ Consensus de classification	Classe chimique dans le système MeSH ⁶	Type de produit ⁷
			Activité de TA ER	CI ₅₀ ^b (M)	Activité de TA ER	CI ₅₀ ^{b,3} (M)				
1	4-hydroxytamoxifène	68047-06-3	Pos.	3.97×10^{-9}	Pos.	2.08×10^{-7}	moderate Pos.	Pos.	Hydrocarbure (Cyclique)	Produit pharmaceutique
2	Dibenzo[a,h] anthracène	53-70-3	Pos.	No IC50	Pos.	No IC50	Pos.	PP	Composé polycyclique	Produit chimique de laboratoire, Produit naturel
3	Mifépristone	84371-65-3	Pos.	5.61×10^{-6}	Nég.	-	faiblement Pos.	Nég.	Stéroïde	Produit pharmaceutique
4	Raloxifène HCl	82640-04-8	Pos.	7.86×10^{-10}	Pos.	1.19×10^{-9}	Pos. modéré	Pos.	Hydrocarbure (Cyclique)	Produit pharmaceutique
5	Tamoxifène	10540-29-1	Pos.	4.91×10^{-7}	Pos.	8.17×10^{-7}	Pos.	Pos.	Hydrocarbure (Cyclique)	Produit pharmaceutique
6	17-β-œstradiol	50-28-2	Nég.	-	Nég.	-	PN	PN	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
7	Apigénine	520-36-5	Nég.	-	Nég.	-	Nég.	Nég.	Composé hétérocyclique	Colorant, Produit naturel, Intermédiaire de synthèse pharmaceutique
8	Atrazine	1912-24-9	Nég.	-	Nég.	-	Nég.	PN	Composé hétérocyclique	Herbicide
9	Di-n-butyl phtalate	84-74-2	Nég.	-	Nég.	-	Nég.	Nég.	Ester, Acide phtalique	Ingrédient cosmétique, Produit chimique industriel, Plastifiant
10	Fénarimol	60168-88-9	Nég.	-	Nég.	-	Non testé	PN	Composé hétérocyclique, Pyrimidine	Fongicide
11	Flavone	525-82-6	Nég.	-	Nég.	-	PN	PN	Flavonoïde, Composé hétérocyclique	Produit naturel, Produit pharmaceutique
12	Flutamide	13311-84-7	Nég.	-	Nég.	-	Nég.	PN	Amide	Produit pharmaceutique et vétérinaire
13	Génistéine	446-72-0	Nég.	-	Nég.	-	PN	Nég.	Flavonoïde, Composé hétérocyclique	Produit naturel, Produit pharmaceutique
14	p-n-nonylphenol	104-40-5	Nég.	-	Nég.	-	Non testé	Nég.	Phénol	Intermédiaire chimique
15	Resvératrol	501-36-0	Nég.	-	Nég.	-	PN	Nég.	Hydrocarbure	Produit naturel

(Cyclique)

Abréviations: N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service; M = molaire; CI_{50} = concentration induisant la moitié de l'inhibition maximale; Nég. = négative; PN = présumée négative; Pos. = positive; PP = présumée positive.

^a Substances courantes soumises aux essais STTA et de TA ER VM7Luc et classées comme antagonistes des ER ou négatives, utilisées pour évaluer la précision lors de l'étude de validation de l'essai de TA ER VM7Luc (2) (3).

^b La concentration d'essai maximale en l'absence de limites dues à la cytotoxicité ou la solubilité s'élevait respectivement à 1×10^{-3} M (STTA) et 1×10^{-5} M (TA ER VM7Luc).

¹ Valeurs rapportées dans le document Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Partie B (2)

² ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

³ CI_{50} moyennes calculées à partir des valeurs rapportées par les laboratoires impliqués dans l'étude de validation de la méthode de TA ER VM7Luc (XDS, ECVAM et Hiyoshi) (3).

⁴ Activité TA ER attendue, sur la base des effets connus reportés à partir de la base de données historiques du CERI pour l'essai de liaison aux ER, de l'essai utéro-trophique et des informations collectées dans la littérature (2).

⁵ Les substances sont classées comme antagonistes des ER ou négatives d'après les informations des Background Review Documents (BRD) de l'ICCVAM relatifs aux essais de liaison aux ER et de TA ER (31) et les données tirées des publications parues et examinées à la suite des BRD de l'ICCVAM(2) (3) (18) (31).

⁶ Les substances ont été placées dans une ou plusieurs classes de produits chimiques selon le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis, norme reconnue internationalement (disponible à l'adresse : <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Les substances ont été placées dans un ou plusieurs types de produits selon la base de données Hazardous Substances Database de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse : <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE TA ER

Éléments essentiels de la méthode d'essai

11. La présente LDAP s'applique aux méthodes faisant appel à un ER α transfecté de façon stable ou endogène, et une chimère de gène rapporteur transfectée de façon stable et régulée par un ou plusieurs éléments de réponse aux œstrogènes ; d'autres récepteurs, comme ER β , peuvent toutefois être présents. Ces éléments constituent l'essence des méthodes d'essai visées.

Substances témoins

12. Les raisons qui ont amené à proposer les étalons de référence pour l'essai agoniste et antagoniste sont décrites. Les témoins simultanément inclus dans l'essai (négatif, solvant et positif) selon le cas servent à indiquer que la méthode d'essai fonctionne dans les conditions expérimentales, et permettent de comparer les expériences. Ainsi, pour une expérience donnée, les témoins sont généralement pris en compte dans les critères d'acceptabilité (1).

Procédures standard de contrôle de qualité

13. Il convient de suivre les procédures standard de contrôle de qualité décrites pour chaque essai afin de garantir que la lignée cellulaire reste stable au cours des multiples passages, demeure exempte de mycoplasmes (c'est-à-dire exempte de contamination bactérienne), et conserve sa capacité à fournir les réponses médiées par les ER attendues au fil du temps. Par ailleurs, l'identité exacte des lignées cellulaires est vérifiée, ainsi que la présence d'autres contaminants (p. ex. moisissures, levures et virus).

Démonstration de la compétence du laboratoire

14. Avant de tester des produits chimiques inconnus avec l'une des méthodes visées par la présente LDAP, il convient que chaque laboratoire démontre sa capacité à mettre en œuvre la méthode d'essai. Pour démontrer sa capacité à mettre en œuvre la méthode d'essai, il convient que chaque laboratoire teste les 14 substances d'épreuve de compétence indiquées dans le [tableau 3](#) pour l'essai agoniste et les 10 substances d'épreuve de compétence indiquées dans le [tableau 4](#) pour l'essai antagoniste. Cette démonstration de la compétence permet également de confirmer la réactivité du système d'essai. La liste des substances d'épreuve de compétence constitue une sous-catégorie des substances de référence indiquées dans les normes de performance des essais de TA ER (6). Ces substances sont disponibles dans le commerce, représentent les classes de produits chimiques communément associées à une activité œstrogénique agoniste ou antagoniste, manifestent une gamme d'activité correspondant aux puissances attendues pour l'effet agoniste ou antagoniste des ER (de faible à forte), et incluent des substances négatives. Ces substances d'épreuve de compétence sont testées au moins deux fois, à des jours différents. La compétence est démontrée lorsque chaque substance d'épreuve de compétence est correctement classée (réponse positive/négative). L'épreuve de compétence est répétée par chaque technicien dans le cadre de la formation à la méthode d'essai. Selon le type cellulaire, certaines de ces substances d'épreuve peuvent se comporter comme des MSRE et présenter à la fois une activité agoniste et antagoniste. Cependant, dans les tableaux 3 et 4, les substances d'épreuve sont classées par leur activité connue pour être prépondérante; c'est celle qui sera utilisée pour l'évaluation de la capacité à mettre en œuvre la méthode d'essai.

15. Pour démontrer la performance et dans un but de contrôle de la qualité, il convient que chaque laboratoire établisse des bases de données agonistes et antagonistes avec les données des étalons de référence (par exemple le 17 β -estradiol et le tamoxifène), des substances témoins positives et négatives et du solvant témoin (par exemple DMSO). Au début, la base de données est générée à partir d'au moins 10 essais agonistes indépendants (par exemple 17 β -estradiol) et 10 essais antagonistes indépendants (par

exemple tamoxifène). Il convient d'ajouter les résultats de l'analyse ultérieure de ces étalons de référence et témoin solvant pour élargir la base de données et permettre de s'assurer de la compétence et de la performance du bio-essai par le laboratoire au cours du temps.

Tableau 3 : Liste des (14) substances d'épreuve de compétence pour l'essai agoniste⁸

N° ⁷	Substance	N° CAS	Réponse attendue ¹	Essai STTA			Essai de TA ER VM7Luc		Classe chimique dans le système MeSH ⁵	Type de produit ⁶
				TP ₁₀ (M) ²	TP ₅₀ (M) ²	Fourchette de concentrations de l'essai (M)	CE ₅₀ pour VM7Luc (M) ³	Concentration maximale pour l'essai préliminaire (M) ⁴		
14	Diéthylstilbestrol	56-53-1	Pos.	$< 1.00 \times 10^{-11}$	2.04×10^{-11}	$10^{-14} - 10^{-8}$	3.34×10^{-11}	3.73×10^{-4}	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique et vétérinaire
12	17 α -œstradiol	57-91-0	Pos.	4.27×10^{-11}	6.44×10^{-10}	$10^{-11} - 10^{-5}$	1.40×10^{-9}	3.67×10^{-3}	Séroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
15	mésio-hexestrol	84-16-2	Pos.	$< 1.00 \times 10^{-11}$	2.75×10^{-11}	$10^{-11} - 10^{-5}$	1.65×10^{-11}	3.70×10^{-3}	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
11	4-tert-octylphénol	140-66-9	Pos.	1.85×10^{-9}	7.37×10^{-8}	$10^{-11} - 10^{-5}$	3.19×10^{-8}	4.85×10^{-3}	Phénol	Intermédiaire chimique
9	Génistéine	446-72-0	Pos.	2.24×10^{-9}	2.45×10^{-8}	$10^{-11} - 10^{-5}$	2.71×10^{-7}	3.70×10^{-4}	Flavonoïde, composé hétérocyclique	Produit naturel et pharmaceutique
6	Bisphénol A	80-05-7	Pos.	2.02×10^{-8}	2.94×10^{-7}	$10^{-11} - 10^{-5}$	5.33×10^{-7}	4.38×10^{-3}	Phénol	Intermédiaire chimique
2	Kaempférol	520-18-3	Pos.	1.36×10^{-7}	1.21×10^{-6}	$10^{-11} - 10^{-5}$	3.99×10^{-6}	3.49×10^{-3}	Flavonoïde, composé hétérocyclique	Produit naturel
3	Phtalate de butyle et de benzyle	85-68-7	Pos.	1.14×10^{-6}	4.11×10^{-6}	$10^{-11} - 10^{-5}$	1.98×10^{-6}	3.20×10^{-4}	Acide carboxylique, ester, acide phtalique	Plastifiant, produit chimique industriel
4	<i>p,p'</i> -méthoxychlore	72-43-5	Pos.	1.23×10^{-6}	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	1.92×10^{-6}	2.89×10^{-3}	Hydrocarbure (halogéné)	Pesticide, produit vétérinaire
1	Éthylparaben	120-47-8	Pos.	5.00×10^{-6}	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	2.48×10^{-5}	6.02×10^{-3}	Acide	Produit

									carboxylique, phénol	pharmaceutique, conservateur
17	Atrazine	1912-24-9	Nég.	-	-	$10^{-10} - 10^{-4}$	-	4.64×10^{-4}	Composé hétérocyclique	Herbicide
20	Spironolactone	52-01-7	Nég.	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	2.40×10^{-3}	Lactone, stéroïde	Produit pharmaceutique
21	Kétoconazole	65277-42-1	Nég.	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	$9,41 \times 10^{-5}$	Composé hétérocyclique	Produit pharmaceutique
22	Réserpine	50-55-5	Nég.	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	1.64×10^{-3}	Composé hétérocyclique, indole	Produit pharmaceutique et vétérinaire

Abréviations : N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service ; CE₅₀ = concentration efficace de la substance d'essai induisant une réponse égale à la moitié de la réponse maximale ; Nég. = négative ; Pos. = positive ; TP₁₀ (et TP₅₀) = concentration de la substance d'essai pour laquelle l'activité est égale à 10 % (ou 50 % pour la TP₅₀) de l'activité maximale induite par le témoin positif (E2 à 1 nM), dans chaque plaque.

¹Les substances sont classées comme positives ou négatives pour l'effet agoniste des ER d'après les informations des Background Review Documents (BRD) de l'ICCVAM relatifs aux essais de liaison aux ER et de TA ER (31), ainsi que des données empiriques et d'autres données tirées des publications parues et examinées à la suite des BRD de l'ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

²Valeurs rapportées dans le document Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (30).

³CE₅₀ moyennes calculées à partir des valeurs rapportées par les laboratoires impliqués dans l'étude de validation de la méthode de TA ER VM7Luc (XDS, ECVAM et Hiyoshi) (3).

⁴Les concentrations indiquées correspondent aux concentrations maximales testées (essai préliminaire) lors de la validation de l'essai de TA ER VM7Luc. Quand les laboratoires impliqués ont employé des concentrations différentes, c'est la concentration maximale qui est indiquée dans le tableau. Voir le tableau 4-10 du document ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

⁵Les substances ont été placées dans une ou plusieurs classes de produits chimiques selon le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis, norme reconnue internationalement (disponible à l'adresse : <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁶Les substances ont été placées dans un ou plusieurs types de produits selon la base de données Hazardous Substances Database de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse : <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

⁷D'après le tableau 1 (List of Reference Chemicals (22) for Evaluation of ER Agonist Accuracy) des normes de performance (6).

⁸Si une substance d'épreuve de compétence n'est plus commercialement disponible, une substance ayant la même classification, et une puissance, un mode d'action et une classe chimique comparable, peut être utilisée.

Tableau 4: Liste des (10) substances d'épreuve de compétence pour l'essai antagoniste

	Substance ^a	N° CAS	Essai ER STTA ¹			Essai de TA ER VM7Luc ²			ER STTA ¹ réponses attendues	ICCVAM ⁵ Consensus de classification	Classe chimique dans le système MeSH ⁶	Type de produit ⁷
			Activité de TA ER	CI ₅₀ (M)	Fourchette de concentrations de l'essai (M)	Activité de TA ER	CI ₅₀ ³ (M)	Concentration maximale pour l'essai préliminaire (M) ⁴				
1	4-hydroxytamoxifène	68047-06-3	Pos.	3.97 × 10 ⁻⁹	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁷	Pos.	2.08 × 10 ⁻⁷	2.58 × 10 ⁻⁴	Pos. modéré	Pos.	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique
2	Raloxifène HCl	82640-04-8	Pos.	7.86 × 10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹² – 10 ⁻⁷	Pos.	1.19 × 10 ⁻⁹	1.96 × 10 ⁻⁴	Pos. modéré	Pos.	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique
3	Tamoxifène	10540-29-1	Pos.	4.91 × 10 ⁻⁷	10 ⁻¹⁰ – 10 ⁻⁵	Pos.	8.17 × 10 ⁻⁷	2.69 × 10 ⁻⁴	Pos.	Pos.	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique
4	17β-estradiol	50-28-2	Nég.	-	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁴	Nég.	-	3.67 × 10 ⁻³	Nég.*	PN	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
5	Apigénine	520-36-5	Nég.	-	10 ⁻⁹ – 10 ⁻⁴	Nég.	-	3.70 × 10 ⁻⁴	Nég.	Nég.	Composé hétérocyclique	Colorant, Produit naturel, Intermédiaire de synthèse pharmaceutique
6	Di-n-butyl phtalate	84-74-2	Nég.	-	10 ⁻⁸ – 10 ⁻³	Nég.	-	3.59 × 10 ⁻³	Nég.	Nég.	Ester, Acide phtalique	Ingrédient cosmétique, Produit chimique industriel, Plastifiant
7	Flavone	525-82-6	Nég.	-	10 ⁻⁸ – 10 ⁻³	Nég.	-	4.50 × 10 ⁻⁴	Nég.*	PN	Flavonoïde, Composé hétérocyclique	Produit naturel, Produit pharmaceutique

8	Génistéine	446-72-0	Nég.	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	Nég.	-	3.70×10^{-4}	Nég.*	Nég.	Flavonoïde, Composé hétérocyclique	Produit naturel, Produit pharmaceutique
9	p-n-nonylphénol	104-40-5	Nég.	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	Nég.	-	4.54×10^{-4}	non testé	Nég.	Phénol	Intermédiaire chimique
1 0	Resvératrol	501-36-0	Nég.	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	Nég.	-	4.38×10^{-4}	Nég.*	Nég.	Hydrocarbure (cyclique)	Produit naturel

Abréviations: N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service; M = molaire; CI_{50} = concentration induisant la moitié de l'inhibition maximale; Nég. = négative; Nég.* = classée négative sur la base de la revue de la littérature (31); PN = présumée négative; Pos. = positive ;

^a Substances courantes soumises aux essais STTA et de TA ER VM7Luc et classées comme antagonistes des ER ou négatives, utilisées pour évaluer la précision lors de l'étude de validation de l'essai de TA ER VM7Luc (2) (3).

¹ Valeurs rapportées dans le document Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Partie B (2)

² ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

³ CI_{50} moyennes calculées à partir des valeurs rapportées par les laboratoires impliqués dans l'étude de validation de la méthode de TA ER VM7Luc (XDS, ECVAM et Hiyoshi) (3).

⁴ Les concentrations indiquées correspondent aux concentrations maximales testées (essai préliminaire) lors de la validation de l'essai de TA ER VM7Luc. Quand les laboratoires impliqués ont employé des concentrations différentes, c'est la concentration maximale qui est indiquée dans le tableau. Voir le tableau 4-11 du document ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell®ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

⁵ Les substances sont classées comme antagonistes des ER ou négatives d'après les informations des Background Review Documents (BRD) de l'ICCVAM relatifs aux essais de liaison aux ER et de TA ER (31) et les données tirées des publications parues et examinées à la suite des BRD de l'ICCVAM (2) (3) (18) (31).

⁶ Les substances ont été placées dans une ou plusieurs classes de produits chimiques selon le système de classification du Medical Subject Headings (MeSH) de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis, norme reconnue internationalement (disponible à l'adresse : <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁷ Les substances ont été placées dans un ou plusieurs types de produits selon la base de données Hazardous Substances Database de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse : <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Critères d'acceptabilité de l'essai

16. L'acceptation ou le rejet d'un essai dépend de l'évaluation des résultats obtenus avec les étalons de référence et les témoins utilisés pour chaque expérience. Il convient que les TP₅₀ (CE₅₀) ou les CI₅₀ des étalons de référence respectent les critères d'acceptabilité de la méthode d'essai choisie (pour l'essai de STTA voir l'annexe 2, pour l'essai de TA ER VM7Luc voir l'annexe 3), et que tous les témoins positifs et négatifs soient classés correctement par les expérimentations acceptées. Un laboratoire prouve sa compétence à répéter une méthode d'essai de manière homogène en établissant et entretenant une base de données compilant les résultats historiques pour les étalons de référence et les témoins (voir paragraphe 15). Les écarts-types (ET) ou coefficients de variation (CV) des moyennes des paramètres d'ajustement des courbes de réponse des étalons de référence obtenus après plusieurs expériences peuvent servir à mesurer la reproductibilité intra-laboratoire.

De plus, on respectera les principes suivants eu égard aux critères d'acceptabilité :

- Il convient que les données soient suffisantes pour évaluer quantitativement l'activation des ER (pour l'essai agoniste) ou leur inhibition (pour l'essai antagoniste) (c'est-à-dire efficacité et puissance).
- L'activité moyenne du marqueur obtenue avec la concentration de référence de la substance œstrogénique de référence est supérieure ou égale à la réponse minimale préconisée dans les méthodes d'essai, par rapport à la réponse du véhicule (solvant) témoin, afin de garantir une sensibilité adéquate. S'agissant des méthodes d'essais de STTA et de TA ER VM7Luc, ce minimum correspond à quatre fois la réponse moyenne du véhicule témoin pour chaque plaque.
- Les concentrations testées restent inférieures à la limite de solubilité des produits chimiques d'essai et ne sont pas cytotoxiques.

Analyse des données

17. Pour déterminer si une réponse est positive ou négative, on s'appuiera sur la procédure d'interprétation des données établie pour chaque méthode d'essai.

18. Le respect des critères d'acceptabilité (paragraphe 16) indique que la méthode d'essai fonctionne correctement, mais ne garantit pas que chaque essai lancé fournira des données exactes. La réplication des résultats du premier essai constitue la meilleure indication que les valeurs obtenues sont exactes. Si deux essais donnent des résultats reproductibles (par ex. s'ils concluent tous les deux que le produit chimique d'essai est positif), il n'est pas nécessaire d'en réaliser un troisième.

19. Si deux essais ne donnent pas de résultats reproductibles (par ex. produit chimique d'essai positif selon l'un et négatif selon l'autre), ou si un degré de certitude supérieur est requis pour pouvoir conclure, il convient de mener au moins trois essais indépendants. Dans ce cas, la classification est basée sur les deux résultats concordants sur les trois essais menés.

Critères généraux d'interprétation des données

20. Il n'existe actuellement aucune méthode d'interprétation des données d'essai de TA ER universellement reconnue. Cependant, il convient que les évaluations qualitatives (par ex. activité positive ou négative) et/ou quantitatives (par ex. CE₅₀, TP₅₀, CI₅₀) de l'activité médiée par les ER s'appuient sur des données empiriques et des raisonnements scientifiques solides. Dans la mesure du possible, les résultats positifs seront caractérisés à la fois par l'amplitude de l'effet induit par rapport à la réponse du véhicule (solvant) témoin ou la substance œstrogénique de référence, et par la concentration correspondant à cet effet (par ex. CE₅₀, TP₅₀, RTP_{Max}, CI₅₀ etc.).

Rapport d'essai

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

Méthode d'essai :

- méthode d'essai employée.

Témoins/étalons de référence/produit chimique d'essai

- - source, numéro de lot, date limite d'utilisation, si disponible ;
- - stabilité du produit chimique d'essai lui-même, si elle est connue ;
- - solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues ;
- - mesures du pH, de l'osmolalité et du précipité apparu dans le milieu auquel le produit chimique d'essai est ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant :

- - apparence physique, solubilité dans l'eau et autres propriétés physicochimiques pertinentes ;
- - données d'identification chimique : nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges :

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

Solvant/Véhicule :

- caractérisation (nature, fournisseur et lot) ;
- justification du choix du solvant/véhicule ;
- solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant/véhicule, le cas échéant.

Cellules :

- type et source des cellules :
 - ER est-il exprimé de façon endogène ? Dans le cas contraire, quel(s) récepteur(s) a/ont été transfecté(s) ;
 - chimère(s) de gènes rapporteurs utilisée(s) (y compris les espèces d'origine) ;
 - méthode de transfection ;
 - méthode de sélection employée pour maintenir une transfection stable (le cas échéant) ;
 - la méthode de transfection permet-elle d'obtenir des lignées stables ?
- nombre de passages des cellules après leur décongélation ;
- nombre de passages des cellules au moment de leur décongélation ;

- méthodes d'entretien des cultures cellulaires.

Conditions d'essai :

- limites de solubilité ;
- description des méthodes d'évaluation de la viabilité employées ;
- composition du milieu, concentration de CO₂ ;
- concentrations du produit chimique d'essai ;
- volume de véhicule et du produit chimique d'essai ajouté ;
- température d'incubation et humidité ;
- durée du traitement ;
- densité cellulaire au début et au cours du traitement ;
- standard de référence positifs et négatifs ;
- réactifs marqueurs (nom du produit, fournisseur, lot) ;
- critères d'interprétation des résultats positif, négatif ou équivoque.

Vérification de l'acceptabilité :

- multiplication de l'induction dans chaque plaque d'essai et comparaison par rapport au minimum requis pour la méthode d'essai concernée eu égard aux données historiques des témoins ;
- valeurs réelles des logCE₅₀, logTP₅₀, logIC₅₀ et pente de Hill pour les témoins positifs et étalons de référence simultanément inclus dans l'essai ;

Résultats :

- données brutes et normalisées ;
- niveau d'induction maximum ;
- données relatives à la cytotoxicité ;
- concentration minimale avec effet (CME), le cas échéant ;
- RTP_{Max}, TP_{Max}, TP₅₀, IC₅₀ et/ou CE₅₀, s'il y a lieu ;
- relation concentration-réponse, si possible ;
- analyses statistiques, le cas échéant, ainsi qu'une mesure de l'erreur et de la confiance (par exemple erreur-type de la moyenne, écart-type, CV ou IC 95 %) et description de la façon dont ces données ont été obtenues.

Discussion des résultats

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE(1)

1. OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Série sur les Essais et l'Evaluation (No. 34.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
2. OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
3. ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL[®] ER (BG1Luc ER TA) Test Method, An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
4. Pujol P. et al. (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): p. 5367-73.
5. Rogers J.M. et Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): p. 67-82.
6. OCDE (2012). Performance Standards for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455), Série sur les Essais et l'Evaluation (No. 173.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
7. OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation In Vitro Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.174). Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
8. OECD. (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, Série sur les Essais et l'Evaluation (No.150), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
9. Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, *Climacteric*, 5 Suppl 2: p. 20-6.
10. Welboren W.J. et al. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: what are the Targets and how are they Regulated?, *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): p. 1073-89.
11. Younes M. et Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): p. 63-6.

12. Jefferson W.N. et al. (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B.*, 777(1-2): p. 179-189.
13. Sonneveld E. et al. (2006). Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol. Sci.*, 89(1): p. 173-187.
14. Takeyoshi M. et al. (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti-Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, *Toxicology Letters*, 126(2): p. 91-98.
15. Combes, R.D. (2000), "Endocrine disruptors: a critical review of in vitro and in vivo testing strategies for assessing their toxic hazard to humans", *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 28(1): p. 81-118.
16. Escande A. et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.* 71(10): p. 1459-69.
17. Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol. Lett.*, 102-103, 677-680.
18. EDSTAC. (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final report. Disponible en anglais à l'adresse : [\[http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edspoverview/finalrpt.html\]](http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/edspoverview/finalrpt.html).
19. ICCVAM. (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays, Disponible en anglais à l'adresse : [\[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/edfinalrpt0503/edfinalrpt.pdf\]](http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/edfinalrpt0503/edfinalrpt.pdf).
20. Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor β - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, *Journal of Endocrinology*, 163(3): p. 379-383.
21. Ogawa S. et al. (1998) The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor β (hER β) and its Heterodimerization with ER α *In Vivo* and *In Vitro*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(1): p. 122-126.
22. Enmark, E. et al. (1997). Human Estrogen Receptor β -gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12): p. 4258-4265.
23. Ball L.J. et al. (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2): p. 204-211.
24. Barkhem T. et al. (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists", *Mol. Pharmacol.*, 54(1): p. 105-12.
25. Deroo B.J. et Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- β : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): p. 1703-1714.

26. Harris D.M. et al (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta-Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, *Experimental Biology and Medicine*, 230(8): p. 558-568.
27. Anderson J.N., Clark J.H. et Peck E.J. Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor-Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(6): p. 1460-1468.
28. Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): p. 515-522.
29. Gorski J. et al. (1968). Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, *Recent Progress in Hormone Research*, 24: p. 45-80.
30. Jensen E.V. et al. (1967). Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3):p. 547-569.
31. ICCVAM. (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No. 03-4505.). Available at: [http://www.iccvam.niehs.nih.gov/docs/endo_docs/final1002/erta_brd/ERTA034505.pdf].
32. Kanno J. et al. (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, *Environ. Health Persp.* 111:1550-1558.
33. Kanno J. et al (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, *Environ. Health Persp.*, 109:785-94.
34. Kanno J. et al. (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1530-1549.
35. Geisinger, et al. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
36. Baldwin, et al. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth in vitro, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
37. Li, Y., et al. (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
38. Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

ANNEXE 1

Définitions et abréviations

Activité anti-œstrogénique : capacité d'un produit chimique à inhiber l'action du 17 β -œstradiol médiée par le récepteur d'œstrogène.

Activité œstrogénique : capacité d'un produit chimique à reproduire la capacité du 17 β -œstradiol à se fixer aux récepteurs d'œstrogène et à les activer. L'activité œstrogénique médiée par hER α peut être détectée en appliquant la présente LDAP.

Agoniste : substance qui provoque une réponse, par exemple une transcription, lorsqu'elle se lie à un récepteur spécifique.

Antagoniste : type de ligand d'un récepteur ou type de produit chimique qui ne provoque pas en soi de réponse biologique mais bloque ou atténue la réponse due aux agonistes

ARN : acide ribonucléique

CC : Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens

CE₅₀ : concentration efficace du produit chimique d'essai induisant la moitié de la réponse maximale

CI₅₀ : concentration efficace du produit chimique d'essai induisant la moitié de l'inhibition maximale

CME (Concentration minimale avec effet) : concentration la plus faible du produit chimique d'essai induisant une réponse (soit la concentration la plus faible du produit chimique d'essai pour laquelle l'augmentation de l'induction est statistiquement différente de celle du véhicule témoin concurrent)

Critères d'acceptabilité : normes minimales concernant la performance des témoins et étalons de référence de l'essai. Pour qu'un essai soit jugé valide, tous les critères d'acceptabilité doivent être respectés.

Compétence : capacité à conduire correctement une méthode d'essai, démontrée avant de tester des substances inconnues

CV : coefficient de variation

Cytotoxicité : effets dommageables sur la structure ou les fonctions de la cellule pouvant entraîner *in fine* la mort cellulaire et traduits éventuellement par une réduction du nombre de cellules présentes dans le puits à la fin de la phase d'exposition ou par une réduction de la capacité à mesurer une fonction cellulaire en comparaison avec le véhicule témoin concurrent

DCC-FBS : *Dextran-coated charcoal treated fetal bovine serum* (sérum bovin fœtal traité au charbon enrobé de dextrans)

DMEM : *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* (milieu de Eagle modifié de Dulbecco)

DMSO : diméthylsulfoxyde

E2 : 17 β -œstradiol

Étude: La gamme complète du travail expérimental réalisé pour évaluer un produit chimique d'essai spécifique, unique, en utilisant une méthode d'essai spécifique. Une étude comprend toutes les étapes incluant les essais de dilution du produit chimique d'essai dans le milieu d'essai, les essais préliminaires de détermination des concentrations, tous les essais complets nécessaires, les analyses de données, l'assurance qualité, l'évaluation de la cytotoxicité, etc. La réalisation d'une étude permet la classification de l'activité du produit chimique d'essai vis-à-vis du type de toxicité évalué par la méthode d'essai (i.e. active, inactive ou non concluant) et permet de caractériser la réponse par rapport à l'étalon de référence positif.

ER : *Estrogen Receptor* (récepteur des œstrogènes)

ERE : *Estrogen Response Element* (élément de réponse aux œstrogènes)

Essai: expérimentation individuelle qui évalue l'action d'un produit chimique sur l'aspect biologique de la méthode d'essai. Chaque essai est une expérimentation complète réalisée sur des puits en répliquat, en même temps et avec des cellules qui proviennent de la même réserve de cellules.

Essai indépendant: expérimentation indépendante, séparée, qui évalue l'action d'un produit chimique sur l'aspect biologique de la méthode d'essai, utilisant des cellules qui proviennent de réserves de cellules différentes, des produits chimiques fraîchement dilués, et réalisée soit à des jours différents soit le même jour mais par un opérateur différent.

Essai STTA : *Stably Transfected Transactivation Assay*, se dit de l'essai de transactivation des ER α fondé sur la lignée cellulaire HeLa 9903

ET : écart-type

Étalon de référence : substance de référence utilisée pour démontrer l'adéquation d'une méthode d'essai. Pour les essais de TA ER STTA et VM7Luc, il s'agit du 17 β -œstradiol.

FBS : *Fetal Bovine Serum* (sérum bovin fœtal)

Fiabilité : mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires en utilisant le même protocole. Elle est évaluée par calcul de la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires.

HeLa : lignée de cellules de col utérin immortalisées d'origine humaine

HeLa9903 : sous-clone de la lignée cellulaire HeLa transfecté de façon stable avec un hER α et un gène rapporteur de la luciférase

hER α : récepteur des œstrogènes α humain

hER β : récepteur des œstrogènes β humain

ICCVAM : *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives)

LDAP : Ligne directrice pour les essais axée sur la performance

« **Me-too test** »: en langage familier, méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Synonyme de méthode d'essai similaire.

Méthode d'essai: dans le contexte d'une LDAP, une méthode d'essai est une des méthodologies acceptées comme valide puisqu'elle remplit les critères de performance décrits dans la LD. Les éléments de la méthode d'essai incluent, par exemple, une lignée cellulaire spécifique avec des conditions de croissance associées, un milieu spécifique dans lequel est conduit l'essai, les conditions de préparation des plaques, la disposition et la dilution des produits chimiques d'essai, et toute autre mesure obligatoire de contrôle de la qualité ainsi que les étapes d'évaluation de données qui y sont associées.

Méthodes d'essai de référence : méthodes d'essai sur lesquelles se fonde la présente LDAP

Méthode d'essai validée : méthode d'essai ayant fait l'objet d'études de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment sa précision) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter que les performances d'une méthode d'essai validée peuvent être insuffisantes en termes de précision et de fiabilité pour qu'elle soit jugée acceptable pour les besoins envisagés (1).

MMTV : *Mouse Mammary Tumor Virus* (virus de tumeur mammaire de souris)

Morphologie cellulaire : forme et apparence des cellules cultivées en monocouche dans un seul puits d'une plaque de culture tissulaire. Les cellules moribondes présentent souvent une morphologie anormale.

MSO : milieu sans œstrogènes. Il s'agit du milieu de Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) complémenté par 4.5 % de FBS traité au charbon enrobé de dextrane, 1.9 % de L-glutamine et 0.9 % de Pen-Strep.

MT : métallothionéine

Normes de performance : normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent : (1) les éléments essentiels de la méthode d'essai ; (2) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée ; et (3) les niveaux de précision et de fiabilité, comparables à ceux obtenus pour la méthode d'essai validée, que la méthode d'essai proposée doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (1).

OHT : 4-hydroxytamoxifène

PE : perturbation endocrinienne

Pertinence : description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité à des fins spécifiques. Elle définit le degré auquel l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. La pertinence tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai (1).

Précision (concordance) : degré de conformité entre les résultats de la méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Le terme est souvent utilisé indifféremment avec le terme « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (1).

Reproductibilité inter-laboratoires : mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances peuvent produire des résultats similaires en termes

qualitatifs et quantitatifs. La reproductibilité inter-laboratoires est déterminée au cours des processus de pré-validation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. Elle est parfois désignée par reproductibilité entre laboratoires (1).

Reproductibilité intra-laboratoire : détermination du degré auquel divers membres du personnel qualifié d'un même laboratoire réussissent à obtenir des résultats identiques en ayant recours à un protocole spécifique à des moments différents. Elle est parfois désignée par reproductibilité au sein du laboratoire (1).

RLU : *Relative Light Units* (unités relatives de luminescence)

RPMI : milieu RPMI 1640 complété par 0.9 % de Pen-Strep et 8.0 % de sérum bovin fœtal (FBS)

RTP_{Max} : niveau maximum de réponse induite par un produit chimique d'essai, exprimé en pourcentage de la réponse induite par 1 nM de E2 sur la même plaque

Sensibilité : proportion des substances positives/actives qui sont correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (1).

Spécificité : proportion des substances négatives/inactives qui sont correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (1).

Substance : dans le contexte du SGH de l'ONU (1), désigne un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, mais à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans en affecter la stabilité ni modifier la composition

Substances d'épreuve de compétence : sous-catégorie des produits chimiques de référence indiqués dans les normes de performance, et qu'un laboratoire peut employer pour démontrer sa compétence technique à mettre en œuvre une méthode d'essai normalisée. En général, on sélectionne à cet effet des substances qui représentent toute la gamme des réponses, sont disponibles dans le commerce et pour lesquelles on dispose de données de référence de bonne qualité.

Substance œstrogénique de référence (témoin positif, TP) : 17 β -œstradiol (E2, CAS 50-28-2)

TA (Transactivation) : initiation de la synthèse de l'ARNm en réponse à un signal chimique spécifique, comme la liaison d'un œstrogène à un récepteur des œstrogènes

TA ER: transactivation des récepteurs des œstrogènes.

Témoin faiblement positif : substance faiblement active sélectionnée parmi les substances de référence et incluse dans l'ensemble des essais pour aider à garantir leur bon fonctionnement

TP (témoin positif) : substance fortement active, idéalement le 17 β -œstradiol, incluse dans l'ensemble des essais pour aider à garantir leur bon fonctionnement

TP₁₀ : concentration du produit chimique d'essai pour laquelle l'activité mesurée dans le cadre d'un essai agoniste est égale à 10 % de l'activité maximale induite par le témoin positif (E2 à 1 nM pour l'essai STTA), dans chaque plaque

TP₅₀ : concentration du produit chimique d'essai pour laquelle l'activité mesurée dans le cadre d'un essai agoniste est égale à 50 % de l'activité maximale induite par le témoin positif (E2 à la concentration de référence propre à la méthode d'essai), dans chaque plaque

TP_{Max} : concentration du produit chimique d'essai induisant la réponse RTP_{Max}

Traitement au charbon enrobé de dextrane : traitement du sérum utilisé pour la culture cellulaire. Souvent nommé « *stripping* » (désorption), ce traitement permet d'éliminer les hormones endogènes et les protéines de liaison associées

Transcription : synthèse de l'ARNm

Transfection stable : procédé consistant à transférer de l'ADN dans des cellules de culture de manière à ce qu'il intègre leur génome de façon stable, permettant l'expression stable des gènes ainsi transfectés. Des clones de cellules transfectées de façon stable sont ensuite sélectionnés par des marqueurs stables (p. ex. en fonction de leur résistance à la G418).

UVCB: *Chemical Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials* (substances chimiques de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matières biologiques)

Validation : processus permettant d'évaluer la fiabilité et la pertinence d'une approche, d'une méthode ou d'un procédé à des fins particulières (1)

VM7 : cellules immortalisées d'adénocarcinome qui expriment les récepteurs des œstrogènes de manière endogène

VM7Luc4E2 : lignée cellulaire **VM7Luc4E2** dérivée de cellules immortalisées d'adénocarcinome d'origine humaine **VM7** capables d'exprimer les deux types de récepteurs des œstrogènes (ER α et ER β) de manière endogène, et qui ont été transfectées de façon stable avec le plasmide pGudLuc7.ERE. Ce plasmide contient quatre copies d'un oligonucléotide de synthèse contenant un élément de réponse aux œstrogènes en amont du promoteur du virus de tumeur mammaire de souris (MMTV) ainsi que le gène rapporteur de la luciférase de luciole. **VT (véhicule témoin)** : solvant utilisé pour solubiliser les substances d'essai et témoins, et faisant l'objet d'un essai sans solutés

ANNEXE 2**Essai de transactivation faisant intervenir le récepteur des œstrogènes humain transfecté de façon stable pour la détection de l'activité œstrogénique agoniste et antagoniste des substances chimiques à l'aide de la lignée cellulaire hER α -HeLa-9903****REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES** (Voir aussi **INTRODUCTION GÉNÉRALE**, page 1)

1. L'essai de transactivation (TA) s'appuie sur la lignée cellulaire hER α -HeLa-9903 pour identifier les substances présentant une activité œstrogénique agoniste médiée par le récepteur des œstrogènes alpha humain (hER α). L'étude de validation de l'essai de transactivation par transfection stable (STTA) menée par l'Institut japonais de recherche et d'évaluation des produits chimiques, et utilisant une lignée cellulaire hER α -HeLa-9903 pour détecter l'activité agoniste et antagoniste des œstrogènes médiée par le récepteur des œstrogènes α humain (hER α), a démontré la pertinence et la fiabilité de l'essai aux fins prévues (1).
2. Cette méthode d'essai est conçue spécifiquement pour détecter la transactivation médiée par hER α avec la chimioluminescence comme paramètre de mesure. Cependant, des signaux de luminescence non médiés par les récepteurs ont été rapportés pour des concentrations de phytoœstrogènes supérieures à 1 μ M en raison de la suractivation du gène rapporteur luciférase (2) (3). Tandis que la courbe dose-réponse indique que l'activation du système ER a véritablement lieu à faible concentration, il convient que l'expression de la luciférase obtenue pour des concentrations élevées de phytoœstrogènes ou de composés similaires suspectés d'induire une suractivation du gène rapporteur luciférase par un mécanisme proche de celui des phytoœstrogènes soit examinée attentivement dans les systèmes d'essai de TA par ER transfecté de façon stable (appendice 1).
3. Il convient de consulter l'« **INTRODUCTION GÉNÉRALE** » et les « **ELEMENTS DE LA METHODE D'ESSAI DE LA TA ER** » (pages 1-14) avant de mettre en œuvre la présente méthode à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette Ligne directrice sont indiquées à l'annexe 1.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI (Voir aussi **INTRODUCTION GÉNÉRALE**, page 1)

4. Le présent essai est utilisé pour signaler la liaison d'un ligand à un récepteur œstrogénique. Une fois cette liaison établie, le complexe récepteur-ligand subit une translocation vers le noyau où il se fixe à certains éléments de réponse de l'ADN et transactive le gène rapporteur de la luciférase de luciole, induisant une augmentation de l'expression cellulaire de l'enzyme luciférase. La luciférine est un substrat transformé par l'enzyme luciférase en produit bioluminescent mesurable quantitativement par un luminomètre. Ainsi, l'activité de la luciférase peut être évaluée rapidement et à faible coût à l'aide des nombreux kits d'essai disponibles dans le commerce.
5. Ce système d'essai utilise la lignée cellulaire hER α -HeLa-9903, dérivée d'une tumeur de col utérin d'origine humaine et comportant deux chimères insérées de façon stable : (i) la chimère d'expression de hER α (encodant la totalité du récepteur humain), et (ii) une chimère du gène rapporteur de la luciférase de luciole portant cinq séquences répétées en tandem d'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) de vitellogénine et régie par un élément promoteur de la métallothionéine (MT) de souris avec motif TATA. Il a été déterminé que le gène chimère de MT de souris avec motif TATA présente les meilleures performances, c'est pourquoi il est communément utilisé. Ainsi, cette lignée cellulaire hER α -HeLa-9903 permet de mesurer

la capacité d'un produit chimique d'essai à provoquer une transactivation de l'expression du gène luciférase médiée par hER α .

6. Dans le cas de l'essai agoniste des ER, l'interprétation des données est soumise au critère suivant : le niveau de réponse maximum provoqué par un produit chimique d'essai est-il supérieur ou égal à une réponse agoniste correspondant à 10 % de la réponse provoquée par une concentration induisant une réponse maximale du témoin positif, soit 1 nM de 17 β -œstradiol (E2), c'est-à-dire la TP₁₀. Dans le cas de l'essai antagoniste des ER, l'interprétation des données est soumise au critère suivant : la réponse montre-t-elle une réduction d'activité d'au moins 30 % par rapport à la réponse induite par le témoin produisant le pic (25 pM de E2), en l'absence de cytotoxicité. L'analyse et l'interprétation des données sont développées plus en détail aux paragraphes 35 – 47.

PROCÉDURE

Lignées cellulaires

7. Cet essai est mis en œuvre avec la lignée cellulaire hER α -HeLa-9903 transfectée de façon stable. Cette lignée peut être obtenue auprès de la banque cellulaire JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources)² après signature d'un accord de transfert de matériel.

8. Seules des cellules exemptes de mycoplasmes sont utilisées pour cet essai. La meilleure méthode de détection sensible d'une infection mycoplasmaïque est la RCP-TR (réaction en chaîne par polymérase en temps réel) (4) (5) (6).

Stabilité de la lignée cellulaire

9. Pour contrôler la stabilité de la lignée cellulaire, il convient d'utiliser le E2, le 17 α -œstradiol, la 17 α -méthyltestostérone et la corticostérone comme étalons de référence pour l'essai agoniste; il convient également que la courbe concentration-réponse complète soit relevée au moins une fois au cours de l'essai sur l'ensemble de la plage de concentrations d'essai présentée dans le tableau 1, et que les résultats soient en accord avec ceux du tableau 1.

10. Dans le cas de l'essai antagoniste, il convient que des courbes de concentration complètes pour deux étalons de référence, le tamoxifène et le flutamide, soient relevées de façon simultanée, avec chaque essai. Il conviendra de s'assurer d'une classification qualitative correcte quant au caractère positif ou négatif des deux substances.

Conditions de culture et de dépôt des cellules

11. Les cellules sont maintenues dans un milieu essentiel minimum de Eagle (EMEM) sans rouge de phénol, complété par 60 mg/l d'antibiotique (Kanamycine) et 10 % de sérum bovin fœtal traité au charbon enrobé de dextrane (DCC-FBS), dans un incubateur à CO₂ (5 % de CO₂) à 37 ± 1 °C. Lorsqu'une confluence de 75 – 90 % est atteinte, les cellules peuvent être divisées en sous-cultures de 10 mL contenant 0.4 x 10⁵ – 1 x 10⁵ cellules/mL dans des boîtes pour cultures cellulaires de 100 mm de diamètre. Les cellules sont mises en suspension dans EMEM-FBS à 10 % (ce qui équivaut à EMEM avec DCC-FBS) puis déposées dans les puits d'une microplaque pour obtenir une densité de 1 x 10⁴ cellules/100 μ L/puits. Les cellules sont ensuite pré-incubées dans un incubateur à 5 % de CO₂ à 37 ± 1 °C pendant 3 heures avant l'exposition au produit chimique. Le matériel en plastique est exempt de toute activité oestrogénique.

² JCRB Cell Bank : National Institute of Biomedical Innovation

7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japon Fax : +81-72-641-9812

12. Afin de maintenir l'intégrité de la réponse, les cellules cultivées font l'objet de plus d'un passage du stock congelé au milieu conditionné, le nombre de passages ne devant pas dépasser 40. Pour la lignée cellulaire hER α -HeLa-9903, c'est fait en moins de trois mois. Cependant, la performance des cellules peut être diminuée si elles sont cultivées dans des conditions de culture inappropriées.

13. Le DCC-FBS peut être préparé conformément à la description de l'appendice 2, ou obtenu de sources commerciales.

Critère d'acceptabilité

Étalons de référence positifs et négatifs pour l'essai agoniste des ER

14. Avant et pendant l'étude, la réactivité du système d'essai est vérifiée à l'aide des concentrations appropriées d'un œstrogène fort E2, d'un œstrogène faible (17 α -œstradiol), d'un agoniste très faible (17 α -méthyltestostérone) et d'un composé induisant une réponse négative (corticostérone). La fourchette des valeurs acceptables découlant de l'étude de validation (2) est présentée au tableau 1. Ces 4 étalons de référence concomitants sont inclus dans chaque expérience et il convient que les résultats soient compris dans les limites acceptables indiquées. Si tel n'est pas le cas, la raison du non-respect des critères d'acceptabilité est déterminée (par exemple au niveau de la manipulation des cellules ou de la qualité et de la concentration des antibiotiques ou du sérum) et l'essai est répété. Lorsque les critères d'acceptabilité ont été satisfaits, la cohérence dans l'utilisation des matériels de culture cellulaire est essentielle pour garantir une variabilité minimale des valeurs CE₅₀, TP₅₀ et TP₁₀. Les quatre étalons de référence concomitants, qui sont inclus dans chaque expérience (menée dans les mêmes conditions, y compris matériels, niveau de passage des cellules et techniciens), garantissent la sensibilité de l'essai dans la mesure où les valeurs de la TP₁₀ des trois étalons positifs de référence tombent dans la fourchette acceptable, comme cela doit être aussi le cas pour celles des TP₅₀ et CE₅₀ quand elles peuvent être calculées (voir tableau 1).

Tableau 1 : Fourchette des valeurs acceptables pour les 4 étalons de référence dans le cadre de l'essai agoniste

Nom	logTP ₅₀	logTP ₁₀	logCE ₅₀	Pente de Hill	Plage d'essai
17 β - œstradiol (E2) N° CAS : 50-28-2	-11,4 ~ -10,1	< -11	-11,3 ~ -10,1	0,7 ~ 1,5	10 ⁻¹⁴ ~ 10 ⁻⁸ M
17 α -œstradiol N° CAS : 57-91-0	-9,6 ~ -8,1	-10,7 ~ -9,3	-9,6 ~ -8,4	0,9 ~ 2,0	10 ⁻¹² ~ 10 ⁻⁶ M
corticostérone N° CAS : 50-22-6	–	–	–	–	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁴ M
17 α -méthyltestostérone No CAS : 58-18-4	-6,0 ~ -5,1	-8,0 ~ -6,2	–	–	10 ⁻¹¹ ~ 10 ⁻⁵ M

Étalons de référence positifs et négatifs pour l'essai antagoniste des ER

15. Avant et pendant l'étude, la réactivité du système d'essai est vérifiée à l'aide des concentrations appropriées d'une substance positive (tamoxifène), et d'une substance négative (flutamide). La fourchette des

valeurs acceptables découlant de l'étude de validation (2) est présentée au [tableau 2](#). Ces deux étalons de référence concomitants sont inclus dans chaque expérience et il convient que les résultats permettent de les classer correctement, tel qu'indiqué dans les critères. Si tel n'est pas le cas, la raison du non-respect des critères est déterminée (par exemple au niveau de la manipulation des cellules ou de la qualité et de la concentration des antibiotiques ou du sérum) et l'essai est répété. De plus, les valeurs de CI50 pour une substance positive (le tamoxifène) devront être calculées, les résultats devant se situer dans des limites acceptables données. Lorsque les critères d'acceptabilité ont été satisfaits, la cohérence dans l'utilisation des matériels de culture cellulaire est essentielle pour garantir une variabilité minimale des valeurs de CI₅₀. Les deux étalons de référence concomitants, qui sont inclus dans chaque expérience (menée dans les mêmes conditions, y compris matériels, niveau de passage des cellules et techniciens), garantissent la sensibilité de l'essai (voir tableau 2).

Tableau 2 : Fourchette des valeurs acceptables pour les 2 étalons de référence dans le cadre de l'essai antagoniste

Nom	Critère	LogCI50	Plage d'essai
Tamoxifène No CAS: 10540-29-1	Positif: CI ₅₀ devra être calculée	-5.942 ~ -7.596	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M
Flutamide No CAS: 13311-84-7	Négatif: CI ₃₀ ne devra pas être calculée	-	10 ⁻¹⁰ ~ 10 ⁻⁵ M

Témoin positif et véhicule témoin

16. Le témoin positif (TP) pour l'essai agoniste des ER (1 nM de E2) et pour l'essai antagoniste des ER (10 µM TAM) est au minimum tripliqué dans chaque plaque. De même, le véhicule utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai fait l'objet au minimum d'un essai réalisé en triplicat dans chaque plaque en tant que véhicule témoin (VT). Outre ce VT, quand le TP utilise un véhicule différent de celui du produit chimique d'essai, cet autre véhicule fait également l'objet d'un essai de contrôle réalisé au moins en triplicat sur la même plaque que le TP.

Critères de qualité pour l'essai agoniste des ER

17. L'activité luciférase moyenne du témoin positif (1 nM de E2) est au moins 4 fois l'activité moyenne du VT pour chaque plaque. Le choix de ce critère est fondé sur la fiabilité des valeurs des paramètres d'évaluation tirées de l'étude de validation (historiquement des multiplications d'induction de quatre à 30 fois).

18. En matière de contrôle de la qualité de l'essai, il convient que l'augmentation d'induction correspondant à la TP₁₀ du témoin positif concurrent (1 nM de E2) dépasse de 1 + 2 ET (écarts-types) la valeur de l'induction (= 1) du VT concurrent. À des fins d'établissement des priorités, la TP₁₀ peut s'avérer utile pour simplifier l'analyse des données nécessaire par rapport à une analyse statistique. L'analyse statistique fournit certes des informations concernant la signification statistique, mais ne constitue pas pour autant un paramètre quantitatif concernant le potentiel relatif à la concentration, et présente donc moins d'intérêt pour l'établissement des priorités.

Critères de qualité pour l'essai antagoniste des ER

19. L'activité luciférase moyenne du témoin produisant le pic (25 pM de E2) est au moins 4 fois l'activité moyenne du VT pour chaque plaque. Le choix de ce critère est fondé sur la fiabilité des valeurs des paramètres d'évaluation tirées de l'étude de validation.

20. En matière de contrôle de la qualité de l'essai, il convient que l'activation transcriptionnelle relative (ATR) de 1nM de E2 dépasse 100%, la ATR dans une plage allant de 0.1 à 1µM de 4-hydroxytamoxifène (OHT) soit inférieure à 40.6% et l'ATR de 100 µM de digitonine (Dig) soit inférieure à 0%. Le laboratoire peut choisir une concentration de OHT sur la base d'un test préliminaire de OHT lors de la mise en œuvre de l'essai. Tous les autres critères de compétence et d'acceptabilité doivent être remplis, y compris la CI₅₀ de tamoxifène.

Démonstration de la compétence du laboratoire (voir paragraphe 14 et tableaux 3 et 4 dans « **ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE TA ER** » de cette Ligne directrice (pages 8-16)).

Véhicule

21. Le diméthylsulfoxyde (DMSO), ou un solvant approprié, est utilisé comme véhicule témoin concurrent à la même concentration pour les témoins négatif et positif ainsi que pour les produits chimiques d'essai. Les produits chimiques d'essai sont dissouts dans un solvant capable de les solubiliser et miscible avec le milieu cellulaire. L'eau, l'éthanol (pureté entre 95 % et 100 %) et le DMSO conviennent à cet effet. En cas d'emploi du DMSO, sa teneur ne dépasse pas 0.1 % (v/v). Pour tout véhicule, il convient de démontrer que le volume maximum utilisé n'est pas cytotoxique et qu'il n'interfère pas avec les performances de l'essai.

Préparation des produits chimiques d'essai

22. Les produits chimiques d'essai sont en général dissouts dans du DMSO ou un autre solvant approprié. Cette préparation est alors fractionnée en séries de solutions identiques diluées au 1/10 dans le même solvant. Ces dernières sont destinées à la dilution avec les milieux.

Solubilité et cytotoxicité : essai préliminaire de détermination des concentrations

23. Un essai préliminaire est nécessaire afin de déterminer la plage de concentrations appropriée pour le produit chimique d'essai, et de vérifier si cette dernière est susceptible de présenter des problèmes de solubilité ou de cytotoxicité. Tout d'abord, les produits chimiques sont testés jusqu'à une concentration maximale de 1 µL/mL, 1 mg/mL, ou 1 mM, la concentration résultante la plus basse étant retenue. En fonction de la cytotoxicité ou de l'absence de solubilité observée dans l'essai préliminaire, la première des expérimentations finales teste le produit chimique à des dilutions en série logarithmiques commençant par la concentration maximale admissible (par exemple 1 mM, 100 µM, 10 µM, etc. ; toute apparition d'un trouble ou d'un précipité est notée. L'essai est répété une seconde fois, et une troisième si nécessaire, en ajustant les concentrations de manière à mieux caractériser les courbes dose-concentration et à éviter les concentrations auxquelles le produit chimique se révèle insoluble ou excessivement cytotoxique.

24. Dans le cas des agonistes et des antagonistes des ER, l'interprétation des données prend en compte l'influence de degrés de cytotoxicité croissants pouvant altérer de façon importante, voire éliminer, la réponse sigmoïde type. Il convient de mettre en œuvre des méthodes de mesure de la cytotoxicité, permettant de recueillir des données sur une viabilité des cellules de 80 %, à l'aide d'un essai adapté éprouvé en laboratoire.

25. Si les résultats de l'essai de cytotoxicité indiquent que la concentration du produit chimique d'essai a abouti à une réduction supérieure ou égale à 20 % du nombre de cellules, cette concentration est alors

considérée comme cytotoxique et toutes les concentrations supérieures ou égales à ce seuil de cytotoxicité sont exclues de l'évaluation.

Exposition au produit chimique d'essai et organisation de la plaque d'essai

26. La procédure relative à la dilution des produits chimiques (étapes 1 et 2) et à l'exposition aux cellules (étape 3) peut être menée comme suit :

Étape 1 : chaque produit chimique d'essai fait l'objet d'une dilution en série dans le DMSO, ou un solvant approprié, puis est déposée dans les puits d'une plaque microtitre de façon à obtenir les séries de concentrations finales fixées auparavant lors de l'essai préliminaire de détermination des concentrations [typiquement dans une gamme couvrant, par exemple, 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM et 10 pM (10^{-3} - 10^{-11} M)] pour des essais en triplicat.

Étape 2 : dilution du produit chimique : diluer tout d'abord 1.5 µL le produit chimique d'essai dans le solvant pour obtenir 500 µL de milieu.

Étape 3 : exposition des cellules aux produits chimiques : ajouter 50 µL de la dilution dans le milieu (préparée à l'étape 2) dans un puits d'essai contenant 10^4 cellules/100 µL/puits.

Le volume final de milieu recommandé dans chaque puits est de 150 µL.

Les échantillons d'essai et les étalons de référence peuvent être répartis tel que présenté dans le [tableau 3](#) et dans le [tableau 4](#).

Tableau 3 : Exemple de répartition des concentrations des étalons de référence dans la plaque d'essai dans l'essai agoniste des ER

Ligne	17 α -méthyltestostérone			Corticostérone			17 α -oestradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0.1 pM	→	→
G	conc 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0.01 pM	→	→
H	VT	→	→	→	→	→	TP	→	→	→	→	→

VT : véhicule témoin (0.1% de DMSO) ; TP : témoin positif (1 nM de E2)

27. Les étalons de référence (E2, 17 α -oestradiol, 17 α -méthyltestostérone et corticostérone) sont inclus dans chaque essai ([tableau 3](#)). Chaque plaque d'essai inclut également des puits contenant le TP, traités avec 1 nM de E2 pouvant provoquer une induction maximale de E2, et des puits contenant le véhicule témoin (VT), traités avec le DMSO (ou un solvant approprié) seul ([tableau 4](#)). Si des cellules issues de sources différentes (divergeant par leur nombre de passage ou leur lot d'origine par exemple) sont utilisées dans la même expérience, les étalons de référence sont testés avec chacune de ces sources cellulaires.

Tableau 4 : Exemple de répartition des concentrations des produits chimiques d'essai et des étalons témoins dans la plaque d'essai dans l'essai agoniste des ER

Ligne	Produit chimique d'essai 1			Produit chimique d'essai 2			Produit chimique d'essai 3			Produit chimique d'essai 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0.1 pM	→	→
G	conc 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0.01 pM	→	→
H	VT	→	→	→	→	→	TP	→	→	→	→	→

VT : véhicule témoin (DMSO) ; TP : témoin positif (1 nM de E2)

Table 5: Exemple de répartition des concentrations des étalons de référence dans la plaque d'essai dans l'essai antagoniste des ER

	Tamoxifène			Flutamide			Produit chimique d'essai 1			Produit chimique d'essai 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0.1% DMSO	→	→	→	→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VT	→	→	→	→	→	TP	→	→	→	→	→

VT : véhicule témoin (0.1% DMSO), TP : témoin positif (1 nM de E2), OHT : 4-Hydroxytamoxifène, Dig: Digitonin.

 : Puits contenant 25pM de E2 pour produire le pic

28. Pour évaluer l'activité antagoniste des produits chimiques, on devra ajouter dans les puits d'essai placés aux lignes de A à G 25pM de E2 pour produire le pic. Les étalons de référence (tamoxifène et flutamide) sont inclus dans chaque essai. Chaque plaque d'essai inclut également des puits contenant le TP, traités avec 1 nM de E2 pouvant servir de contrôle qualité de la lignée cellulaire hERα-HeLa-9903, des puits contenant le véhicule témoin (VT) traités avec le DMSO (ou un solvant approprié), des puits contenant 0.1% DMSO, traités avec du DMSO ajouté à la concentration de E2 produisant le pic et correspondant ainsi au « témoin produisant le pic », des puits contenant 1 µM OHT et des puits contenant 100 µM de Dig (tableau 5). Les autres plaques d'essai suivent la même disposition dans la plaque, sans les puits des étalons de référence (tableau 6). Si des cellules issues de sources différentes (divergeant par leur nombre de passage ou leur lot d'origine par exemple) sont utilisées dans la même expérience, les étalons de référence sont testés avec chacune de ces sources cellulaires.

Table 6: Exemple de répartition des concentrations des produits chimiques d'essai et des étalons témoins dans la plaque d'essai dans l'essai antagoniste des ER

	Produit chimique d'essai 1			Produit chimique d'essai 2			Produit chimique d'essai 3			Produit chimique d'essai 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0.1% DMSO	→	→		→	→	1 µM OHT	→	→	100 µM Dig	→	→
H	VT	→	→	→	→	→	TP	→	→	→	→	→

VT : véhicule témoin (0.1% DMSO), TP : témoin positif (1 nM de E2), OHT : 4-

Hydroxytamoxifène, Dig: Digitonin

 : Puits contenant 25pM de E2 pour produire le pic

29. L'absence d'effets de bord est confirmée, le cas échéant, et en cas de suspicion, la répartition dans la plaque est modifiée de façon à éliminer de tels effets, par exemple en n'utilisant pas les puits situés sur les bords.

30. Après l'ajout des produits chimiques, les plaques d'essai sont placées dans un incubateur à 5 % de CO₂, à 37 ± 1 °C pendant 20 à 24 heures, afin d'induire la synthèse de produits de gènes rapporteurs.

31. Lorsque les composés sont hautement volatils, des considérations particulières s'appliquent. Dans ces cas, les puits témoins adjacents peuvent en effet induire des faux positifs, à comparer avec les valeurs témoins attendues et historiques. Dans les rares cas où la volatilité pourrait s'avérer problématique, l'utilisation d'un dispositif d'étanchéité est recommandée afin d'isoler efficacement les puits les uns des autres pendant le déroulement de l'essai.

32. Pour un même produit chimique, les essais définitifs sont répétés à des jours différents afin de garantir l'indépendance des résultats.

Essai luciférase

33. Il est possible d'utiliser pour cet essai un réactif d'essai luciférase commercial [par exemple le Système d'essai luciférase Steady-Glo® (Promega, E2510, ou équivalent)] ou un système d'essai luciférase standard (Promega, E1500, ou équivalent), tant que les critères d'acceptabilité sont satisfaits. Les réactifs d'essai sont choisis en fonction de la sensibilité du luminomètre utilisé. Dans le cas d'un système d'essai luciférase standard, l'utilisation d'un agent de lyse cellulaire (Promega, E1531, ou équivalent) est nécessaire avant l'ajout du substrat. Les instructions à suivre pour l'utilisation du réactif luciférase sont fournies par le fabricant.

ANALYSE DES DONNÉES

Essai agoniste des ER

34. Dans le cas de l'essai agoniste des ER, l'activité transcriptionnelle relative au TP (1 nM de E2) est obtenue par analyse des signaux luminescents dans une même plaque en suivant les étapes suivantes (d'autres traitements mathématiques équivalents sont aussi acceptables) :

Étape 1. Calculer la valeur moyenne correspondant au VT.

Étape 2. Soustraire cette valeur moyenne correspondant au VT de la valeur obtenue pour chaque puits afin de normaliser les données.

Étape 3. Calculer la moyenne des valeurs normalisées pour le TP.

Étape 4. Diviser la valeur normalisée obtenue pour chaque puits de la plaque par la moyenne des valeurs normalisées pour le TP (TP = 100 %).

Le résultat final obtenu dans chaque puits correspond à l'activité transcriptionnelle relative de ce puits par rapport à la réponse correspondant au TP.

Étape 5. Calculer la valeur moyenne de l'activité transcriptionnelle relative pour chaque groupe de concentration du produit chimique d'essai. Les résultats livrent deux informations : l'activité transcriptionnelle moyenne (réponse) et la concentration induisant cette réponse (voir section suivante).

Détermination des inductions CE₅₀, TP₅₀ et TP₁₀

35. Le calcul de la CE₅₀ se fonde sur une courbe concentration-réponse complète, dont le relevé n'est pas toujours possible ou pratique en raison d'éventuelles limitations de la plage de concentrations (par exemple en cas de problèmes de cytotoxicité ou de solubilité). Cependant, la CE₅₀ et le niveau d'induction maximum (correspondant à la valeur maximale de l'équation de Hill) étant des valeurs informatives, elles sont signalées dans la mesure du possible. Le calcul de la CE₅₀ et du niveau d'induction maximum s'effectue à l'aide d'un logiciel statistique adapté, comme Graphpad Prism.

36. Si l'équation logistique de Hill est applicable aux données concentration-réponse, la CE₅₀ est calculée par l'équation suivante (15) :

$$Y = \text{base} + (\text{sommet} - \text{base}) / (1 + 10 \exp((\log \text{CE}_{50} - X) \times \text{pente de Hill}))$$

où :

X est le logarithme de la concentration ; et,

Y est la réponse, mesurée entre la base et le sommet de la courbe sigmoïde.

La base est fixée à zéro dans l'équation logistique de Hill.

37. Les données suivantes sont fournies pour chacun des produits chimiques d'essai :

(i) la RTP_{Max} qui indique le niveau de réponse maximum induit par le produit chimique d'essai, exprimée en pourcentage de la réponse induite par 1 nM de E2 sur la même plaque, ainsi que la TP_{Max} (concentration correspondant à la RTP_{Max}) ; et

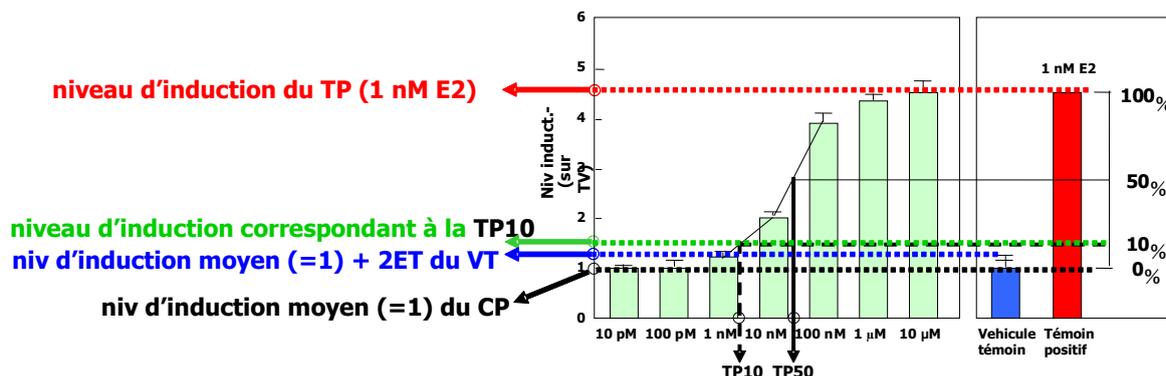
(ii) pour les produits chimiques positifs, les concentrations correspondant à la TP₁₀ et, le cas échéant, la TP₅₀.

38. La valeur TP_x peut être calculée par interpolation entre deux points de la courbe X-Y, l'un situé immédiatement au dessus et l'autre immédiatement en dessous de la valeur TP_x recherchée. Considérant que ces points immédiatement au dessus et en dessous de la valeur TP_x ont pour coordonnées respectives (c,d) et (a,b), la valeur TP_x peut être calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\log[\text{TP}_x] = \log[c] + (x - d) / (d - b)$$

39. La description des valeurs relatives au TP est représentée par la [figure 1](#) ci-dessous.

Figure 1. Exemple de déduction des valeurs relatives au TP. Le TP (1 nM de E2) est inclus dans chaque plaque d'essai



Essai antagoniste des ER

40. Dans le cas de l'essai antagoniste des ER, l'activité transcriptionnelle relative (ATR) au témoin produisant le pic (25 pM de E2) est obtenue par analyse des signaux lumineux dans une même plaque en suivant les étapes suivantes (d'autres traitements mathématiques équivalents sont aussi acceptables) :

Étape 1. Calculer la valeur moyenne correspondant au VT.

Étape 2. Soustraire cette valeur moyenne correspondant au VT de la valeur obtenue pour chaque puits afin de normaliser les données.

Étape 3. Calculer la moyenne des valeurs normalisées pour le témoin produisant le pic.

Étape 4. Diviser la valeur normalisée obtenue pour chaque puits de la plaque par la moyenne des valeurs normalisées pour le témoin produisant le pic (témoin produisant le pic = 100 %).

Le résultat final obtenu dans chaque puits correspond à l'activité transcriptionnelle relative de ce puits par rapport à la réponse correspondant au témoin produisant le pic.

Étape 5. Calculer la valeur moyenne de l'activité transcriptionnelle relative pour chaque groupe de concentration.

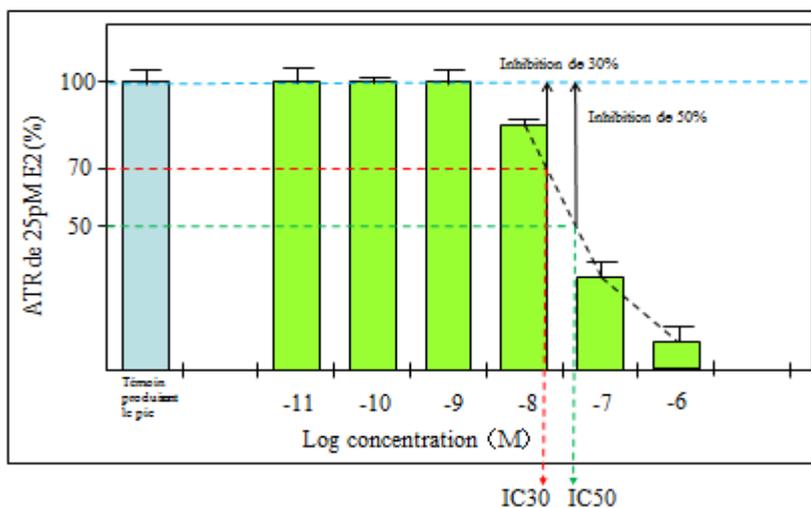
Détermination des inductions CI_{30} et CI_{50}

41. Pour les produits chimiques positifs, les concentrations correspondant à la TP_{10} et, le cas échéant, la TP_{50} , sont fournies.

42. La valeur IC_x peut être calculée par interpolation entre deux points de la courbe X-Y, l'un situé immédiatement au-dessus et l'autre immédiatement en dessous de la valeur IC_x recherchée. Considérant que ces points immédiatement au-dessus et en dessous de la valeur IC_x ont pour coordonnées respectives (c,d) et (a,b), la valeur IC_x peut être calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\ln CI_x = a - (b - (100 - x)) (a - c) / (b - d)$$

Figure 2. Exemple de déduction des valeurs relatives à la CI. Le témoin produisant le pic (25 pM de E2) est inclus dans chaque plaque d'essai



ATR : activité transcriptionnelle relative

43. Les résultats s'appuient sur deux (ou trois) essais indépendants. Si deux essais livrent des résultats comparables et par conséquent reproductibles, un troisième essai ne sera pas nécessaire. Pour être acceptables, il convient que les résultats:

- répondent aux critères d'acceptabilité (voir les critères d'acceptabilité paragraphes 14-20)
- sont reproductibles.

*Critères d'interprétation des données***Tableau 7** : Critères d'interprétation des résultats positifs et négatifs pour les essais agonistes des ER

Positif	Si la RTP _{Max} obtenue est supérieure ou égale à 10 % de la réponse du témoin positif dans deux essais sur deux, ou au moins deux essais sur trois.
Négatif	Si la RTP _{Max} obtenue demeure inférieure à 10 % de la réponse du témoin positif dans deux essais sur deux, ou deux essais sur trois.

Tableau 8 : Critères d'interprétation des résultats positifs et négatifs pour les essais antagonistes des ER

Positif	Si la CI ₃₀ est calculée dans deux essais sur deux, ou au moins deux essais sur trois.
Négatif	Si on ne peut pas calculer la CI ₃₀ dans deux essais sur deux, ou deux essais sur trois.

44. Les critères d'interprétation des données sont présentés aux tableaux 7 et 8. Les résultats positifs se caractérisent à la fois par l'amplitude de l'effet induit et par la concentration correspondant à cet effet. L'expression des résultats sous forme de concentration induisant une réponse égale à 50 % (TP₅₀) ou 10 % (TP₁₀) des réponses obtenues avec le TP permet de répondre à ce double objectif. Cependant, un produit chimique d'essai sera jugé positif si sa réponse maximale induite (RTP_{Max}) est supérieure ou égale à 10 % de la réponse du témoin positif dans deux essais sur deux, ou au moins deux essais sur trois, mais elle sera jugée négative si la RTP_{Max} demeure inférieure à 10 % de la réponse du TP dans deux essais sur deux, ou deux essais sur trois.

45. Les valeurs TP₁₀, TP₅₀ et TP_{Max} dans l'essai agoniste et CI₃₀ et CI₅₀ dans l'essai antagoniste peuvent être obtenues à l'aide d'une feuille de calcul disponible avec la Ligne directrice pour les essais sur le site Internet public de l'OCDE³.

46. Deux essais répétés devraient suffire pour déterminer la TP₁₀ ou la TP₅₀ ou la CI₃₀ ou la CI₅₀. Néanmoins, si le niveau de référence des données dans la même plage de concentrations présente un coefficient de variation (CV ; %) trop élevé, ces données sont susceptibles d'être considérées comme non valides, et il est nécessaire que l'origine d'une telle variation soit identifiée. Il convient que le CV des données brutes tripliquées (c'est-à-dire des données sur l'intensité de la luminescence) correspondant aux points de calcul de la TP₁₀ soit inférieur à 20 %.

47. Le respect des critères d'acceptabilité indique que le système d'essai fonctionne correctement, mais ne garantit pas que chaque essai fournisse des données exactes. La duplication des résultats obtenus lors de la première expérimentation constitue la meilleure assurance que les valeurs obtenues sont correctes (voir paragraphes 44 et 45).

48. Dans le cas de l'essai agoniste des ER, lorsqu'un supplément d'information est nécessaire, en plus des objectifs de dépistage et de détermination des priorités visés par la présente Ligne directrice concernant les produits chimiques d'essai positifs, en particulier les produits chimiques allant de TP₁₀ à TP₄₉ ainsi que ceux suspectés d'induire une sur-stimulation de la luciférase, une confirmation que l'activité luciférase

³ [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

observée est due exclusivement à la réponse médiée par ER α peut être obtenue à l'aide d'un antagoniste ER α (voir [appendice 1](#)).

RAPPORT D'ESSAI

49. Voir le paragraphe 20 de « **ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE TA ER** » (pages 8-16 de cette Ligne directrice).

BIBLIOGRAPHIE(2)

1. OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.225), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
2. Escande A. et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
3. Kuiper G.G. et al. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
4. Spaepen M. et al. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol Lett.* 78(1), 89-94.
5. Kobayashi H. et al. (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.
6. Dussurget O. et Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953-9.
7. De Lean A., Munson P.J et Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves”, *Am. J. Physiol.*, 235, E97-E102.

Appendice 1

Faux positifs : évaluation des signaux de luminescence non médiés par les récepteurs

1. Les faux positifs dans l'essai agoniste des ER pourraient trouver leur origine dans l'activation du gène luciférase non médiée par ER, dans l'activation directe d'un produit du gène, ou dans une fluorescence de source indéterminée. De tels effets se signalent par une courbe dose-réponse incomplète ou inhabituelle. En cas de suspicion, l'effet d'un antagoniste du ER (p. ex. 4-hydroxytamoxifène [OHT] à une concentration non toxique) sur la réponse est examiné. Le pur antagoniste ICI 182780 ne semble pas indiqué à cette fin dans la mesure où une concentration insuffisante de ICI 182780 est susceptible d'abaisser la valeur correspondant au véhicule témoin, perturbant ainsi l'analyse des données.

2. Pour garantir la validité de cette approche, il convient de tester les éléments suivants dans une même plaque :

- activité agoniste du produit chimique inconnu en présence et absence de 10 μ M de OHT ;
- VT (en triplicat) ;
- OHT (en triplicat) ;
- 1 nM de E2 (en triplicat) comme témoin positif (TP) agoniste ;
- 1 nM de E2 + OHT (en triplicat).

3. ***Critères d'interprétation des données***

Note : tous les puits contiennent la même concentration de véhicule.

- Si l'activité agoniste du produit chimique inconnu n'est PAS modifiée par le traitement avec l'antagoniste des ER, le résultat est considéré comme « négatif ».
- Si l'activité agoniste du produit chimique inconnu est totalement inhibée, les critères d'interprétation sont simplement appliqués.
- Si l'activité agoniste à la plus faible concentration est égale ou supérieure à la réponse du TP₁₀, la substance inconnue est inhibée de façon équivalente ou en excès par rapport à la réponse du TP₁₀. Il convient de calculer la différence entre les réponses relatives aux puits ayant reçu l'antagoniste des ER et celles relatives aux puits ne l'ayant pas reçu. Cette différence entre puits traités et non traités est alors considérée comme la véritable réponse et est utilisée pour calculer les paramètres nécessaires à la décision de classification du produit chimique.

4. ***Analyse des données***

Vérifier les critères d'acceptabilité. Vérifier le CV entre les puits traités dans les mêmes conditions.

1. Calculer la valeur moyenne obtenue avec le VT ;
2. soustraire cette valeur moyenne du VT de la valeur obtenue pour chaque puits **non** traité avec OHT ;
3. calculer la moyenne de la réponse obtenue correspondant à OHT ;
4. soustraire la valeur moyenne du VT de la valeur obtenue pour chaque puits traité avec OHT ;
5. calculer la valeur moyenne obtenue avec le TP ;
6. calculer l'activité transcriptionnelle relative de tous les autres puits par rapport au TP.

Appendice 2

Préparation du sérum traité au charbon enrobé de dextrane (DCC)

1. Le traitement du sérum avec du charbon enrobé de dextrane (DCC) est une méthode générique pour éliminer les composés œstrogéniques contenus dans le sérum ajouté au milieu cellulaire, afin d'exclure de la réponse tout biais causé par des résidus œstrogéniques dans le sérum. Cette procédure permet de traiter 500 mL de sérum bovin fœtal (FBS).

Composants

2. Les matériaux et équipements suivants sont nécessaires :

Matériaux

- Charbon actif
- Dextrane
- Chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Sucrose
- 1 M de solution tampon HEPES (pH 7.4)
- Eau ultra pure obtenue par filtration

Équipement

- Récipient de verre stérilisé par autoclave (taille à adapter en fonction des besoins)
- Centrifugeuse de laboratoire classique (température réglable à 4 °C)

Procédure

3. La procédure suivante convient pour des tubes de centrifugeuse de 50 mL :

[Jour 1] Préparer une suspension de charbon enrobé de dextrane dans un litre d'eau ultra pure contenant 1.5 mM de MgCl_2 , 0.25 M de sucrose, 2.5 g de charbon, 0.25 g de dextrane et 5 mM de HEPES et agiter à 4 °C pendant toute la nuit.

[Jour 2] Répartir la suspension dans les tubes de 50 mL de la centrifugeuse et centrifuger à 10 000 tours/min et 4 °C pendant 10 minutes. Ôter le surnageant et mettre en réserve une moitié du dépôt de charbon à 4 °C pour l'utiliser le Jour 3. Disperser l'autre moitié du charbon dans du FBS ayant été décongelé lentement pour éviter la formation d'un précipité, puis neutralisé à chaud (56 °C) pendant 30 minutes. Transférer dans un récipient de verre stérilisé par autoclave, comme un erlenmeyer. Agiter la suspension modérément à 4 °C durant toute la nuit.

[Jour 3] Répartir la suspension dans le FBS dans les tubes de 50 mL de la centrifugeuse et centrifuger à 10 000 tours/min et 4 °C pendant 10 minutes. Recueillir le FBS pour le transférer avec la portion de charbon préparée et mise en réserve le Jour 2. Disperser ce dépôt de charbon dans le FBS et agiter modérément à 4 °C durant toute la nuit.

[Jour 4] Répartir la suspension pour une centrifugation à 10 000 tours/min et 4 °C pendant 10 minutes. Stériliser le surnageant par filtration sur filtre stérile 0.2 µm. Ce FBS traité au DCC est conservé à -20 °C et demeure utilisable un an maximum.

ANNEXE 3**Méthode d'essai de transactivation faisant appel au récepteur d'œstrogène VM7Luc pour identifier les substances chimiques présentant une activité œstrogénique agoniste et antagoniste****REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES** (Voir aussi **INTRODUCTION GÉNÉRALE**, page 1)

1. Cet essai fait appel à la lignée cellulaire VM7Luc4E2⁴. La méthode d'essai de TA ER VM7Luc a été validée par le National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), et par le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM). Les lignées cellulaires VM7Luc expriment majoritairement les ER α et une quantité minimale de ER β , de manière endogène (2) (3) (4).
2. Le présent essai s'applique à un large éventail de substances, à condition que celles-ci soient solubles dans le diméthylsulfoxyde (DMSO, n° CAS 67-68-5), ne réagissent pas avec ce solvant ni avec le milieu de culture cellulaire, et ne soient pas cytotoxiques aux concentrations d'essai. Si l'emploi du DMSO est impossible, on pourra utiliser un autre véhicule, comme l'éthanol ou l'eau (voir paragraphe 12). Les démonstrations du fonctionnement de la méthode d'essai de TA ER VM7Luc pour l'effet (ant)agoniste suggèrent que les données ainsi obtenues pourraient livrer des informations sur les mécanismes d'action médiés par les ER, et servir à déterminer quelles substances tester en priorité.
3. Cette méthode d'essai est conçue spécifiquement pour détecter la transactivation médiée par les hER α et les hER β avec la chimioluminescence comme paramètre de mesure. Les bio-essais ont fréquemment recours à la chimioluminescence car la luminescence jouit d'un rapport signal/bruit élevé (10). Cependant, dans les essais cellulaires, l'activité de la luciférase de luciole peut être perturbée par les substances qui inhibent l'enzyme luciférase, ce qui se traduit par des résultats décrivant soit une inhibition, soit une augmentation de la luminescence due à la stabilisation de la protéine (10). En outre, dans certains essais faisant appel au gène rapporteur luciférase activé par les ER, on a pu observer des signaux de luminescence non médiés par les récepteurs pour des concentrations de phytoœstrogènes supérieures à 1 μ M en raison de la suractivation du gène rapporteur luciférase (9) (11). Tandis que la courbe dose-réponse indique que l'activation du système ER a véritablement lieu à faible concentration, il convient que l'expression de la luciférase obtenue pour des concentrations élevées de phytoœstrogènes ou de composés similaires suspectés d'induire une suractivation du gène rapporteur luciférase par un mécanisme proche de celui des phytoœstrogènes soit examinée attentivement dans les systèmes d'essai de TA par ER transfecté de façon stable (voir annexe 2).

⁴ Avant juin 2016, cette lignée cellulaire était désignée lignée cellulaire BG1Luc. Les cellules BG-1 ont été décrites à l'origine par Geisinger et al. (1998) (12) et ont été ultérieurement caractérisées par les chercheurs du National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (13). Relativement récemment, on a découvert qu'il existe en fait deux variants différents des cellules BG-1 utilisées par les chercheurs, BG-1 Fr et BG-1 NIEHS. Une analyse approfondie, incluant des tests sur l'ADN, de ces deux lignées cellulaires BG-1 menée par Li et al (2014) (14) a montré que BG-1 Fr était unique et que BG-1 NIEHS, c'est à dire la lignée cellulaire d'origine utilisée pour le développement de l'essai n'était pas la lignée cellulaire d'adénocarcinome ovarien d'origine humaine, mais était en fait un variant de la lignée cellulaire MCF7 de cancer du sein d'origine humaine. La lignée cellulaire utilisée dans l'essai, citée à l'origine comme étant BG1Luc4E2 (15), est maintenant désignée VM7Luc4E2 ("V" = variant; "M7" = cellules MCF7). De même, l'essai est maintenant désigné VM7Luc ER TA. Alors que cela modifie l'origine de la lignée cellulaire sur laquelle l'essai est basé, cela n'affecte pas les études de validation publiées ni l'utilité et l'application de cet essai pour le dépistage des produits chimiques œstrogéniques et anti-œstrogéniques

4. Il convient de consulter l'« **INTRODUCTION GENERALE** » et les « **ELEMENTS DE LA METHODE D'ESSAI DE LA TA ER** » (pages 1-18) avant de mettre en œuvre la présente méthode à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette Ligne directrice sont indiquées à l'annexe 1.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI (Voir aussi **INTRODUCTION GÉNÉRALE**, page 1)

5. L'essai sert à indiquer la formation d'une liaison entre ER et ligand, suivie par la translocation du complexe récepteur-ligand ainsi formé vers le noyau. Dans le noyau, le complexe récepteur-ligand se fixe à certains éléments de réponse de l'ADN et transactive le gène rapporteur (*luc*), induisant la production de luciférase et donc l'émission de lumière, laquelle est mesurée à l'aide d'un luminomètre. Ainsi, l'activité de la luciférase peut être évaluée rapidement et à faible coût à l'aide de différents kits disponibles dans le commerce. L'essai de TA ER VM7Luc s'appuie sur une lignée cellulaire d'adénocarcinome du sein d'origine humaine exprimant les ER (BG-1), transfectée de façon stable avec une chimère du gène rapporteur de la luciférase de luciole (*luc*) régulée par quatre éléments de réponse aux œstrogènes insérés en amont du promoteur du virus de tumeur mammaire de souris (MMTV), afin de détecter les substances qui présentent une activité œstrogénique agoniste ou antagoniste *in vitro*. Le promoteur du MMTV ne répond que faiblement aux autres hormones stéroïdiennes ou non stéroïdiennes (8). Les critères d'interprétation des résultats sont décrits en détail au paragraphe 41. En résumé, une réponse positive est caractérisée par une courbe concentration-réponse comportant au moins trois points dont les barres d'erreurs (moyenne \pm écart-type) ne se chevauchent pas, ainsi qu'une différence d'amplitude (unités relatives de luminescence normalisées ou RLU) d'au moins 20 % par rapport à la réponse maximale de l'étalon de référence (17 β -œstradiol [E2, n° CAS 50-28-2] pour l'essai agoniste, mélange chlorhydrate de raloxifène [RAL ; n° CAS 84449-90-1]/E2 pour l'essai antagoniste).

MODE OPÉRATOIRE

Lignée cellulaire

6. Cet essai fait appel à la lignée cellulaire transfectée de façon stable VM7Luc4E2. Elle est actuellement seulement disponible sous accord de licence technique auprès de l'Université de Californie à Davis (Californie, États-Unis)⁵, et de Xenobiotic Detection Systems Inc. à Durham (Caroline du Nord, États-Unis)⁶.

Stabilité de la lignée cellulaire

7. Afin de maintenir la stabilité et l'intégrité de la lignée cellulaire, les cellules cultivées font l'objet de plus d'un passage entre le stock congelé et leur milieu de conservation (voir paragraphe 9). Les cellules ne sont plus cultivées au-delà de 30 passages. S'agissant de la lignée VM7Luc4E2, il faudra trois mois environ pour effectuer les 30 passages.

⁵ Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, courriel : msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649

⁶ Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, courriel : info@dioxins.com, téléphone : 919-688-4804, télécopie : 919-688-4404

Conditions de dépôt et de culture des cellules

8. Il convient de suivre les procédures indiquées dans le document *Guidance on Good Cell Culture Practice* (5) (6) pour assurer la qualité de l'ensemble des matériaux et des méthodes et ainsi garantir l'intégrité, la validité et la reproductibilité de tous les essais réalisés.

9. Les cellules VM7Luc4E2 sont conservées dans le milieu RPMI 1640 additionné de 0.9 % de Pen-Strep et 8.0 % de sérum bovin fœtal (FBS) dans un incubateur réservé à la culture tissulaire et réglé à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, avec une humidité de $90 \pm 5\%$ et une atmosphère contenant $5.0 \pm 1\%$ de CO_2 .

10. Lorsque la confluence atteint environ 80 %, les cellules VM7Luc4E2 sont repiquées et conditionnées dans un milieu sans œstrogène pendant 48 heures. Elles sont alors déposées dans des plaques 96 puits pour y être exposées aux produits chimiques d'essai puis on analyse l'induction œstrogène dépendante de l'activité de la luciférase. Le milieu sans œstrogène (MSO) contient le milieu de Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) sans rouge phénol, additionné de 4.5 % de FBS traité au charbon dextran, 1.9 % de L-glutamine, et 0.9 % de Pen-Strep. Il convient que le matériel en plastique soit exempt de toute activité œstrogénique [voir protocole détaillé (7)].

Critères d'acceptabilité

11. L'acceptation ou le rejet d'un essai dépendent de l'évaluation des résultats obtenus avec l'étalon de référence et les témoins pour chaque expérience menée dans la plaque 96 puits. Chaque étalon de référence est testé à diverses concentrations, et l'essai comprend plusieurs réplicats de chaque concentration de l'étalon et des témoins. Les résultats sont ensuite comparés aux critères de qualité pour ces paramètres, qui découlent des bases de données historiques sur les effets agoniste et antagoniste établies par chaque laboratoire lors de l'épreuve de compétence. Ces bases de données historiques sont constamment mises à jour avec les résultats obtenus pour l'étalon de référence et les témoins. Toute modification des équipements et conditions de laboratoire peut nécessiter le développement de bases de données historiques mises à jour.

Essai de l'effet agoniste

Essai préliminaire

- Induction : on mesure l'effet induit sur la plaque en divisant la valeur moyenne des unités relatives de luminescence (RLU) maximales obtenues avec l'étalon de référence E2 par la valeur moyenne des RLU du témoin DMSO. On observe généralement une induction multipliée par cinq, mais un essai est accepté s'il permet d'obtenir au moins une induction multipliée par quatre.
- Résultats du témoin DMSO : il convient que les RLU du solvant témoin ne dépassent pas 2.5 fois l'écart-type de la valeur moyenne historique des RLU du solvant témoin.
- Si l'un de ces critères n'est pas satisfait, l'expérience est invalidée et elle est répétée.

Essai complet

Cet essai est gouverné par les mêmes critères d'acceptabilité que pour l'essai préliminaire de l'effet agoniste, auxquels s'ajoutent les suivants :

- Résultats de l'étalon de référence : il convient que la courbe concentration-réponse de l'étalon de référence E2 corresponde à une sigmoïde et comporte au moins trois valeurs dans sa partie linéaire.

- Résultats du témoin positif : il convient que les valeurs en RLU du témoin méthoxychlore soient supérieures à la valeur moyenne des RLU du DMSO plus trois fois l'écart-type.
- Si l'un de ces critères n'est pas satisfait, l'expérience est invalidée et elle est répétée.

Essai de l'effet antagoniste

Essai préliminaire

- Inhibition : l'effet inhibiteur sur la plaque est mesuré en divisant la valeur moyenne des unités relatives de luminescence (RLU) maximales obtenues avec l'étalon de référence Ral/E2 par la valeur moyenne des RLU du témoin DMSO. On observe généralement une inhibition de cinq fois la valeur du témoin, mais un essai est accepté s'il permet d'obtenir une inhibition d'au moins trois fois la valeur du témoin.
- Résultats du témoin E2 : il convient que les RLU du témoin E2 ne dépassent pas 2.5 fois l'écart-type de la valeur moyenne historique des RLU du E2.
- Résultats du témoin DMSO : il convient que les RLU du témoin DMSO ne dépassent pas 2.5 fois l'écart-type de la valeur moyenne historique des RLU du solvant témoin.
- Si l'un de ces critères n'est pas satisfait, l'expérience est invalidée et elle est répétée.

Essai complet

Cet essai est gouverné par les mêmes critères d'acceptabilité que pour l'essai préliminaire de l'effet antagoniste, auxquels s'ajoutent les suivants :

- Résultats de l'étalon de référence : il convient que la courbe concentration-réponse de l'étalon de référence Ral/E2 corresponde à une sigmoïde et comporte au moins trois valeurs dans sa partie linéaire.
- Résultats du témoin positif : il convient que les RLU du témoin tamoxifène/E2 soient inférieures à la moyenne des RLU du témoin E2 moins trois fois l'écart-type.
- Si l'un de ces critères n'est pas satisfait, l'expérience est invalidée et elle est répétée.

Étalons de référence, témoins positifs et véhicule témoin

Véhicule témoin (essais des effets agoniste et antagoniste)

12. Le véhicule employé pour dissoudre les produits chimiques d'essai fait l'objet d'un essai en tant que témoin. Dans l'étude de validation de la méthode d'essai utilisant VM7Luc, ce véhicule était du diméthylsulfoxyde à 1 % volumique (DMSO, n° CAS 67-68-5) (voir paragraphe 24). Si l'on fait appel à un autre véhicule que le DMSO, l'ensemble des étalons de référence, des témoins et des produits chimiques d'essai est testé dans le même véhicule, le cas échéant.

Étalon de référence (essai préliminaire pour l'effet agoniste)

13. L'étalon de référence est le E2 (no CAS 50-28-2). Pour l'essai préliminaire, le E2 fait l'objet d'une série de quatre dilutions (1.84×10^{-10} , 4.59×10^{-11} , 1.15×10^{-11} et 2.87×10^{-12} M), chacune de ces concentrations étant testée dans deux puits.

Étalon de référence (essai complet pour l'effet agoniste)

14. Pour l'essai complet, le E2 fait l'objet d'une série de dilutions successives au 1/2 jusqu'à obtenir 11 concentrations allant de 3.67×10^{-10} à 3.59×10^{-13} M, chaque concentration étant testée dans deux puits.

Étalon de référence (essai préliminaire pour l'effet antagoniste)

15. L'étalon de référence est un mélange de Ral (n° CAS 84449-90-1) et de E2 (n° CAS 50-28-2). Pour l'essai préliminaire, le mélange Ral/E2 fait l'objet d'une série de dilutions permettant d'obtenir trois concentrations différentes de Ral (3.06×10^{-9} , 7.67×10^{-10} et 1.92×10^{-10} M) avec une concentration constante de E2 (9.18×10^{-11} M), chaque dilution étant testée dans deux puits.

Étalon de référence (essai complet de l'effet antagoniste)

16. Pour l'essai complet, on prépare une série de dilutions successives au 1/2 du Ral (allant de 2.45×10^{-8} à 9.57×10^{-11} M) avec E2 à concentration constante (9.18×10^{-11} M) pour obtenir neuf concentrations de Ral/E2, testées dans deux puits.

Témoin faiblement positif (agoniste)

17. Le témoin faiblement positif est une solution à 9.06×10^{-6} M de *p,p'*-méthoxychlore (méthoxychlore, n° CAS 72-43-5) dans du MSO.

Témoin faiblement positif (antagoniste)

18. Le témoin faiblement positif est une solution de tamoxifène (n° CAS 10540-29-1) à 3.36×10^{-6} M et de E2 à 9.18×10^{-11} M dans du MSO.

Témoin E2 (essai de l'effet antagoniste uniquement)

19. Le témoin E2 est une solution de E2 à 9.18×10^{-11} M dans du MSO, et sert de témoin négatif de référence.

Augmentation de l'induction (effet agoniste)

20. L'activité luciférase induite par l'étalon de référence (E2) est mesurée en divisant la valeur moyenne des RLU maximales obtenues pour le E2 par la valeur moyenne des RLU correspondant au témoin DMSO. Il convient que ce résultat soit plus de quatre fois plus grand.

Augmentation de l'inhibition (effet antagoniste)

21. L'inhibition moyenne de l'activité luciférase observée avec l'étalon de référence (Ral/E2) est calculée en divisant la valeur moyenne des RLU maximales obtenues pour le mélange Ral/E2 par la valeur moyenne des RLU du témoin DMSO. Il convient que ce résultat soit plus de trois fois plus grand.

Démonstration de la compétence du laboratoire (voir paragraphe 14 et tableaux 3 et 4 dans « ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE TA ER » de cette Ligne directrice (pages 8-16)).

Véhicule

22. Les produits chimiques d'essai sont mis en solution dans un solvant capable de les solubiliser et miscible avec le milieu cellulaire. L'eau, l'éthanol (pureté comprise entre 95 % et 100 %) et le DMSO conviennent à cet effet. En cas d'emploi du DMSO, il convient que sa teneur ne dépasse pas 1 % (v/v). Pour tout véhicule, il convient de démontrer que le volume maximum utilisé n'est pas cytotoxique et qu'il n'interfère pas avec les performances de l'essai. Les étalons de référence et les témoins sont dissous dans du solvant pur puis dilués dans le MSO jusqu'à obtenir les concentrations souhaitées.

Préparation des produits chimiques d'essai

23. Les produits chimiques d'essai sont dissouts dans du DMSO pur (ou un autre solvant approprié), puis dilués dans le MSO jusqu'à obtenir les concentrations souhaitées. L'ensemble des produits chimiques d'essai est amené à température ambiante avant la dissolution et la dilution. De nouvelles solutions de produit chimique d'essai sont préparées pour chaque expérience. Il convient qu'elles ne présentent ni précipité, ni trouble. Des solutions mères d'étalon de référence et de témoins peuvent être préparées à l'avance, mais les solutions et dilutions finales de l'étalon de référence, des témoins et des produits chimiques d'essai seront préparées pour chaque expérience et utilisées dans les 24 heures.

Solubilité et cytotoxicité : Prise en compte dans l'essai préliminaire

24. L'essai préliminaire s'appuie sur une série de sept dilutions successives au 1/10 testées en duplicat. Les produits chimiques d'essai sont d'abord évalués à une concentration maximale de 1 mg/mL (environ 1 mM) pour l'effet agoniste, et 20 µg/mL (environ 10 µM) pour l'effet antagoniste. Les essais préliminaires servent à établir les valeurs suivantes :

- concentrations de départ des produits chimiques d'essai mises en œuvre dans les essais complets ;
- dilutions des produits chimiques d'essai (au 1/2 ou au 1/5) mises en œuvre dans les essais complets.

25. L'évaluation de la viabilité cellulaire et de la cytotoxicité est incluse dans les protocoles de la méthode d'essai des effets agoniste et antagoniste (7), dans les essais préliminaires comme dans les essais complets. L'essai de cytotoxicité employé pour évaluer la viabilité cellulaire dans l'étude de validation de la méthode de TA ER VM7Luc (1) était fondé sur une méthode d'observation visuelle qualitative par cotation, néanmoins une procédure quantitative peut être mise en œuvre à cette même fin [voir protocole (7)]. Les données relatives aux concentrations du produit chimique d'essai qui entraînent une baisse de viabilité cellulaire supérieure à 20 % sont inutilisables.

Exposition au produit chimique d'essai et organisation de la plaque d'essai

26. Les cellules sont comptées et déposées dans des plaques de culture tissulaire à 96 puits (2 x 10⁵ cellules par puits) dans du MSO, puis incubées pendant 24 heures pour leur permettre de s'attacher à la plaque. Le MSO est alors éliminé et remplacé par les solutions de produit chimique d'essai ou de substances de référence dans le MSO, et la plaque est incubée pendant 19 à 24 heures. Les substances très volatiles feront l'objet d'une attention particulière, dans la mesure où elles peuvent donner lieu à de faux positifs quand elles sont à côté de puits contenant un témoin. Le cas échéant, l'utilisation d'un dispositif d'étanchéité pour isoler efficacement les puits les uns des autres pendant le déroulement de l'essai est recommandée.

Essais préliminaires

27. Pour l'essai préliminaire, on utilise l'intégralité d'une plaque 96 puits pour tester jusqu'à six produits chimiques d'essai à sept concentrations différentes obtenues par dilutions successives au dixième et évaluées en duplicat (voir graphiques 1 et 2).

- L'essai préliminaire pour l'effet *agoniste* requiert quatre concentrations de E2 en duplicat, en tant qu'étalon de référence, ainsi que quatre répliquats du témoin DMSO.
- L'essai préliminaire pour l'effet *antagoniste* requiert trois concentrations du mélange Ral/E2 (où E2 reste constant à 9.18×10^{-11} M) en duplicat, en tant qu'étalon de référence, ainsi que trois puits assignés respectivement aux témoins E2 et DMSO.

Graphique 1 : Organisation de la plaque 96 puits pour l'essai préliminaire de l'effet agoniste

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC1-1	PC1-1	PC2-1	PC2-1	PC3-1	PC3-1	PC4-1	PC4-1	PC5-1	PC5-1	PC6-1	PC6-1
B	PC1-2	PC1-2	PC2-2	PC2-2	PC3-2	PC3-2	PC4-2	PC4-2	PC5-2	PC5-2	PC6-2	PC6-2
C	PC1-3	PC1-3	PC2-3	PC2-3	PC3-3	PC3-3	PC4-3	PC4-3	PC5-3	PC5-3	PC6-3	PC6-3
D	PC1-4	PC1-4	PC2-4	PC2-4	PC3-4	PC3-4	PC4-4	PC4-4	PC5-4	PC5-4	PC6-4	PC6-4
E	PC1-5	PC1-5	PC2-5	PC2-5	PC3-5	PC3-5	PC4-5	PC4-5	PC5-5	PC5-5	PC6-5	PC6-5
F	PC1-6	PC1-6	PC2-6	PC2-6	PC3-6	PC3-6	PC4-6	PC4-6	PC5-6	PC5-6	PC6-6	PC6-6
G	PC1-7	PC1-7	PC2-7	PC2-7	PC3-7	PC3-7	PC4-7	PC4-7	PC5-7	PC5-7	PC6-7	PC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VT	VT	VT	VT	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Abréviations : E2-1 à E2-4 = concentrations de l'étalon de référence E2 (par ordre décroissant) ; PC1-1 à PC1-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 1 (PC1) ; PC2-1 à PC2-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 2 (PC2) ; PC3-1 à PC3-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 3 (PC3) ; PC4-1 à PC4-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 4 (PC4) ; PC5-1 à PC5-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 5 (PC5) ; PC6-1 à PC6-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 6 (PC6) ; VT = véhicule témoin (DMSO à 1 % v/v dans le MSO).

Graphique 2 : Organisation de la plaque 96 puits pour l'essai préliminaire de l'effet antagoniste

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC1-1	PC1-1	PC2-1	PC2-1	PC3-1	PC3-1	PC4-1	PC4-1	PC5-1	PC5-1	PC6-1	PC6-1
B	PC1-2	PC1-2	PC2-2	PC2-2	PC3-2	PC3-2	PC4-2	PC4-2	PC5-2	PC5-2	PC6-2	PC6-2
C	PC1-3	PC1-3	PC2-3	PC2-3	PC3-3	PC3-3	PC4-3	PC4-3	PC5-3	PC5-3	PC6-3	PC6-3
D	PC1-4	PC1-4	PC2-4	PC2-4	PC3-4	PC3-4	PC4-4	PC4-4	PC5-4	PC5-4	PC6-4	PC6-4
E	PC1-5	PC1-5	PC2-5	PC2-5	PC3-5	PC3-5	PC4-5	PC4-5	PC5-5	PC5-5	PC6-5	PC6-5
F	PC1-6	PC1-6	PC2-6	PC2-6	PC3-6	PC3-6	PC4-6	PC4-6	PC5-6	PC5-6	PC6-6	PC6-6
G	PC1-7	PC1-7	PC2-7	PC2-7	PC3-7	PC3-7	PC4-7	PC4-7	PC5-7	PC5-7	PC6-7	PC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VT	VT	VT	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Abréviations : E2 = témoin E2 ; Ral-1 à Ral-3 = concentrations de l'étalon de référence Raloxifène/E2 (par ordre décroissant) ; PC1-1 à PC1-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 1 (PC1) ; PC2-1 à PC2-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 2 (PC2) ; PC3-1 à PC3-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 3 (PC3) ; PC4-1 à PC4-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 4 (PC4) ; PC5-1 à PC5-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 5 (PC5) ; PC6-1 à PC6-7 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 6 (PC6) ; VT = véhicule témoin (DMSO à 1 % v/v dans le MSO).

Note : Tous les produits chimiques d'essai sont testés en présence de E2 à 9.18×10^{-11} M.

28. Le volume final de milieu recommandé dans chaque puits s'élève à 200 μ L. On n'utilisera que les plaques d'essai dans lesquelles tous les puits affichent un taux de viabilité cellulaire d'au moins 80 %.

29. La détermination des concentrations de départ pour l'essai complet de l'effet *agoniste* est décrite de manière exhaustive dans le protocole relatif à cet effet (7). En résumé, on applique les critères suivants :

- Si aucun point de la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai n'est situé au-dessus de la moyenne des résultats du témoin DMSO plus trois fois son écart-type, l'essai complet est mené avec une série de 11 dilutions successives à 1/2, à partir de la concentration de saturation du produit chimique d'essai.
- Si la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai contient des points situés au-dessus de la moyenne des résultats du témoin DMSO plus trois fois son écart-type, l'essai complet utilise une série de 11 dilutions successives à partir d'une concentration supérieure de 1 log à la concentration induisant les RLU ajustées maximales lors de l'essai préliminaire. Cette série de 11 dilutions se fait à 1/2 ou 1/5 en fonction du critère suivant :

Une série de dilution à 1/2 est préconisée si la gamme de concentrations ainsi obtenue permet d'observer l'ensemble des réponses attendues sur la base de la courbe concentration-réponse obtenue dans l'essai préliminaire. Dans le cas contraire, les dilutions se font au cinquième.

- Si le produit chimique d'essai affiche une courbe biphasique à l'issue de l'essai préliminaire, il convient que ces deux phases soient aussi étudiées dans l'essai complet.

30. La détermination des concentrations de départ pour l'essai complet de l'effet *antagoniste* est décrite de manière exhaustive dans le protocole relatif à cet effet (7). En résumé, on applique les critères suivants :

- Si aucun point de la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai n'est inférieur à la moyenne des résultats du témoin E2 moins trois fois son écart-type, l'essai complet est mené avec une série de 11 dilutions successives à 1/2, à partir de la concentration de saturation du produit chimique d'essai.
- Si la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai présente des points inférieurs à la moyenne des résultats du témoin E2 moins trois fois son écart-type, l'essai complet est mené avec une série de 11 dilutions successives à partir d'une des concentrations suivantes :
 - la concentration qui donne la valeur la plus faible (RLU ajustées) dans l'essai préliminaire ;
 - la concentration maximale avant saturation [voir protocole pour l'effet antagoniste (7), graphique 14-2] ;
 - la concentration minimale induisant un effet cytotoxique [voir protocole pour l'effet antagoniste (7), graphique 14-3 pour un exemple en la matière].
- Cette série de 11 dilutions se fera à 1/2 ou 1/5 en fonction du critère suivant :

Une série de dilution à 1/2 est préconisée si la gamme de concentrations ainsi obtenue permet d'observer l'ensemble des réponses attendues sur la base de la courbe concentration-réponse obtenue dans l'essai préliminaire. Dans le cas contraire, les dilutions se feront au cinquième.

Essais complets

31. L'essai complet fait appel à une série de 11 dilutions successives (à 1/2 ou 1/5, selon la concentration de départ sélectionnée en fonction des critères pertinents), chaque concentration étant testée dans trois puits de la plaque 96 puits (voir graphiques 3 et 4).

- L'essai complet de l'effet *agoniste* utilise 11 concentrations de E2 en duplicat comme étalon de référence. Sur chaque plaque, quatre puits servent aux réplicats du témoin DMSO, et quatre autres puits sont assignés aux réplicats du témoin méthoxychlore (9.06×10^{-6} M).
- L'essai complet de l'effet *antagoniste* requiert neuf concentrations du mélange Ral/E2 (où E2 reste constant à 9.18×10^{-11} M) en duplicat, en tant qu'étalon de référence, quatre réplicats du témoin E2 à 9.18×10^{-11} M, quatre réplicats du témoin DMSO, et quatre réplicats du tamoxifène à 3.36×10^{-6} M.

Graphique 3 : Organisation de la plaque 96 puits pour l'essai complet de l'effet agoniste

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5	PC1-6	PC1-7	PC1-8	PC1-9	PC1-10	PC1-11	VT
B	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5	PC1-6	PC1-7	PC1-8	PC1-9	PC1-10	PC1-11	VT
C	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5	PC1-6	PC1-7	PC1-8	PC1-9	PC1-10	PC1-11	VT
D	PC2-1	PC2-2	PC2-3	PC2-4	PC2-5	PC2-6	PC2-7	PC2-8	PC2-9	PC2-10	PC2-11	VT
E	PC2-1	PC2-2	PC2-3	PC2-4	PC2-5	PC2-6	PC2-7	PC2-8	PC2-9	PC2-10	PC2-11	Méth
F	PC2-1	PC2-2	PC2-3	PC2-4	PC2-5	PC2-6	PC2-7	PC2-8	PC2-9	PC2-10	PC2-11	Méth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Méth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Méth

Abréviations : PC1-1 à PC1-11 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 1 ; PC2-1 à PC2-11 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 2 ; E2-1 à E2-11 = concentrations de l'étalon de référence E2 (par ordre décroissant) ; Méth = témoin faiblement positif *p,p'*-méthoxychlore ; VT = véhicule témoin DMSO (1 % v/v dans le MSO)

Graphique 4 : Organisation de la plaque 96 puits pour l'essai complet de l'effet antagoniste

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5	PC1-6	PC1-7	PC1-8	PC1-9	PC1-10	PC1-11	VT
B	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5	PC1-6	PC1-7	PC1-8	PC1-9	PC1-10	PC1-11	VT
C	PC1-1	PC1-2	PC1-3	PC1-4	PC1-5	PC1-6	PC1-7	PC1-8	PC1-9	PC1-10	PC1-11	VT
D	PC2-1	PC2-2	PC2-3	PC2-4	PC2-5	PC2-6	PC2-7	PC2-8	PC2-9	PC2-10	PC2-11	VT
E	PC2-1	PC2-2	PC2-3	PC2-4	PC2-5	PC2-6	PC2-7	PC2-8	PC2-9	PC2-10	PC2-11	Tam
F	PC2-1	PC2-2	PC2-3	PC2-4	PC2-5	PC2-6	PC2-7	PC2-8	PC2-9	PC2-10	PC2-11	Tam
G	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Abréviations : E2 = témoin E2 ; Ral-1 à Ral-9 = concentrations de l'étalon de référence Raloxifène/E2 (par ordre décroissant) ; Tam = témoin faiblement positif Tamoxifène/E2 ; PC1-1 à PC1-11 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 1 ; PC2-1 à PC2-11 = concentrations (décroissantes) du produit chimique d'essai 2 ; VT = véhicule témoin DMSO (1 % v/v dans le MSO)

Note : Comme indiqué précédemment, tous les puits contenant l'étalon de référence et le produit chimique d'essai affichent la même concentration de E2 (9.18×10^{-11} M).

32. Pour un même produit chimique, les essais complets sont répétés à des jours différents afin de garantir l'indépendance des résultats. On effectue au moins deux essais complets. Si leurs résultats se contredisent (par ex., un essai montre une réponse positive, l'autre une réponse négative), ou si l'un des essais est inadéquat, on procède à un troisième essai.

Mesure de la luminescence

33. La luminescence est déterminée dans une gamme de 300 à 650 nm, à l'aide d'un luminomètre équipé d'un système d'injection et d'un logiciel contrôlant le volume injecté et l'intervalle de mesure (7). L'émission lumineuse observée pour chaque puits est exprimée en RLU par puits.

ANALYSE DES DONNÉES

Détermination de la CE_{50} et de la CI_{50}

34. La CE_{50} (concentration efficace du produit chimique d'essai correspondant à la moitié de la réponse maximale [effet agoniste]) et la CI_{50} (concentration du produit chimique d'essai induisant la moitié de l'inhibition maximale [effet antagoniste]) sont déterminées à partir des données de la courbe concentration-réponse. S'agissant des produits chimiques d'essai positifs pour une ou plusieurs concentrations, la concentration du produit chimique d'essai qui induit la moitié de la réponse maximale (CI_{50} ou CE_{50}) est calculée à l'aide d'une fonction de Hill ou d'une autre méthode adaptée. La fonction de Hill est un modèle mathématique logistique à quatre paramètres qui associe la concentration du produit chimique d'essai à une réponse (en général selon une fonction sigmoïde) grâce à l'équation suivante :

$$Y = \text{base} + \frac{(\text{sommet} - \text{base})}{1 + 10^{(\log \text{CE}_{50} - X) \text{penteHill}}}$$

Où Y = réponse (en RLU); X = logarithme de la concentration; Base = réponse minimale; Sommet = réponse maximale; $\log \text{CE}_{50}$ (ou $\log \text{CI}_{50}$) = logarithme de la concentration correspondant à la réponse située à mi-chemin entre la base et le sommet; et penteHill = pente de la courbe. Le modèle calcule ainsi les résultats les plus proches pour les valeurs de la base, du sommet, de la pente de Hill, de la CI_{50} et de la CE_{50} . Le calcul de la CE_{50} et de la CI_{50} s'effectue à l'aide d'un logiciel statistique adapté, comme Graphpad Prism®.

Détermination des valeurs aberrantes

35. L'adjonction, entre autres, d'un test Q [voir les protocoles pour les effets agoniste et antagoniste (30)] peut favoriser la qualité de l'arbitrage statistique, afin d'établir quels puits « inutilisables » seront exclus de l'analyse des données.

36. En ce qui concerne les réplicats de l'étalon de référence E2 (échantillon composé de deux puits), la valeur en RLU ajustées d'un réplicat pour une concentration donnée de E2 sera considérée comme aberrante si elle diffère de plus de 20 % de la valeur en RLU obtenue pour la même concentration dans la base de données historique.

Collecte et ajustement des données luminométriques pour l'essai préliminaire

37. Les données brutes livrées par le luminomètre sont transférées dans une feuille de calcul type conçue spécialement pour la présente méthode d'essai. On peut ainsi établir si des valeurs aberrantes doivent être exclues. (Voir Critères d'acceptabilité de l'essai pour les paramètres obtenus dans ces analyses). Les calculs suivants sont effectués :

Effet agoniste

- Étape 1 Calculer la réponse moyenne du véhicule témoin (VT) DMSO.
- Étape 2 Soustraire la valeur moyenne du VT DMSO à la valeur obtenue pour chaque puits afin de normaliser les données.
- Étape 3 Calculer la multiplication moyenne de l'induction observée avec l'étalon de référence (E2).
- Étape 4 Calculer la CE_{50} moyenne pour les produits chimiques d'essai.

Effet antagoniste

- Étape 1 Calculer la réponse moyenne du véhicule témoin (VT) DMSO.
- Étape 2 Soustraire la valeur moyenne du VT DMSO à la valeur obtenue pour chaque puits afin de normaliser les données.
- Étape 3 Calculer la multiplication moyenne de l'inhibition observée avec l'étalon de référence (Ral/E2).
- Étape 4 Calculer la réponse moyenne de l'étalon de référence E2.
- Étape 5 Calculer la CI_{50} moyenne pour les produits chimiques d'essai.

Collecte et ajustement des données luminométriques pour les essais complets

38. Les données brutes livrées par le luminomètre sont transférées dans une feuille de calcul type conçue spécialement pour la présente méthode d'essai. On peut ainsi établir si des valeurs aberrantes doivent être exclues. (Voir Critères d'acceptabilité de l'essai pour les paramètres obtenus dans ces analyses.) Les calculs suivants sont effectués :

Effet agoniste

- Étape 1 Calculer la réponse moyenne du véhicule témoin (VT) DMSO.
- Étape 2 Soustraire la valeur moyenne du VT DMSO à la valeur obtenue pour chaque puits afin de normaliser les données.
- Étape 3 Calculer la multiplication moyenne de l'induction observée avec l'étalon de référence (E2).
- Étape 4 Calculer la CE_{50} moyenne de E2 et des produits chimiques d'essai, respectivement.
- Étape 5 Calculer la valeur moyenne en RLU ajustées obtenue avec le méthoxychlore.

Effet antagoniste

- Étape 1 Calculer la réponse moyenne du véhicule témoin (VT) DMSO.
- Étape 2 Soustraire la valeur moyenne du VT DMSO à la valeur obtenue pour chaque puits afin de normaliser les données.
- Étape 3 Calculer la multiplication moyenne de l'induction observée avec l'étalon de référence (Ral/E2).
- Étape 4 Calculer la CI_{50} moyenne du mélange Ral/E2 et des produits chimiques d'essai, respectivement.
- Étape 5 Calculer la valeur moyenne en RLU ajustées obtenue avec le tamoxifène.
- Étape 6 Calculer la réponse moyenne de l'étalon de référence E2.

Critères d'interprétation des données

39. La méthode de TA ER VM7Luc est conçue comme un outil de l'analyse du poids de la preuve pour contribuer à établir quelles substances tester en priorité à l'aide d'essais *in vivo* de l'effet perturbateur sur le système endocrinien. Cette procédure de priorisation comprend notamment la classification du produit chimique d'essai comme positif ou négatif pour son activité agoniste et antagoniste sur les ER. Les critères d'interprétation des résultats positifs et négatifs appliqués dans l'étude de validation de la méthode de TA ER VM7Luc sont décrits dans le tableau 1.

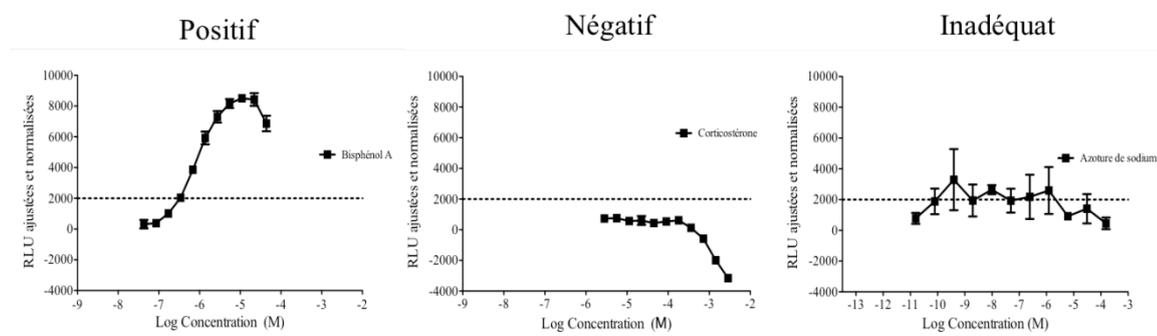
Tableau 1 : Critères d'interprétation des résultats positifs et négatifs

Activité agoniste	
Positif	<ul style="list-style-type: none"> – Les produits chimiques d'essai classés <i>positifs</i> pour leur activité agoniste sur les ER présentent toutes une courbe concentration-réponse constituée d'une base, puis d'une droite de pente croissante et enfin d'un plateau ou d'un sommet. Il arrive que seules deux de ces caractéristiques (base-pente ou pente-sommet) puissent être définies. – La droite de pente positive comporte au moins trois points dont les barres d'erreur (moyenne \pm écart-type) ne se chevauchent pas. Les points formant la ligne de base sont exclus, mais le sommet ou le premier point du plateau peuvent être compris dans la partie linéaire de la courbe. – Pour être classée positif, il convient que le produit chimique induise une réponse dont l'amplitude, c'est-à-dire la différence entre la base et le sommet, est supérieure ou égale à 20 % de la réponse maximale provoquée par l'étalon de référence E2 (soit au moins 2 000 RLU si la valeur maximale induite par l'étalon de référence [E2] est ajustée à 10 000 RLU). – Dans la mesure du possible, on calcule la CE₅₀ de chaque produit chimique positif.
Négatif	Les RLU moyennes ajustées obtenues pour une concentration donnée sont inférieures ou égales à la moyenne des RLU du témoin DMSO plus trois fois son écart-type.
Inadéquat	Les données jugées invalides pour l'établissement d'une activité éventuelle en raison de limites qualitatives ou quantitatives importantes sont considérées comme inadéquates et ne peuvent pas servir à déterminer si un produit chimique d'essai est positif ou négatif. Il convient alors de tester à nouveau le produit chimique d'essai.

Activité antagoniste	
Positif	<ul style="list-style-type: none"> – La courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai est constituée d'une base suivie d'une droite décroissante. – La droite de pente négative comporte au moins trois points dont les barres d'erreur ne se chevauchent pas. Les points formant la ligne de base sont exclus, mais le premier point du plateau peut être compris dans la partie linéaire de la courbe. – On observe une baisse d'activité d'au moins 20 % de la réponse maximale obtenue avec l'étalon de référence Ral/E2 (soit 8 000 RLU ou moins si la réponse maximale de l'étalon de référence [Ral/E2] est ajustée à 10 000 RLU). – Les concentrations maximales non cytotoxiques du produit chimique d'essai sont inférieures ou égales à 1×10^{-5} M. – Dans la mesure du possible, on calcule la CI₅₀ de chaque produit chimique d'essai positif.
Négatif	Toutes les réponses relevées sont supérieures à la PE ₈₀ (80 % de la réponse de E2, soit 8 000 RLU) pour les concentrations inférieures à 1.0×10^{-5} M.
Inadéquat	Les données jugées invalides pour l'établissement d'une activité éventuelle en raison de limites qualitatives ou quantitatives importantes sont considérées comme inadéquates et ne peuvent pas servir à déterminer si un produit chimique d'essai est positif ou négatif. Il convient alors de tester à nouveau le produit chimique d'essai.

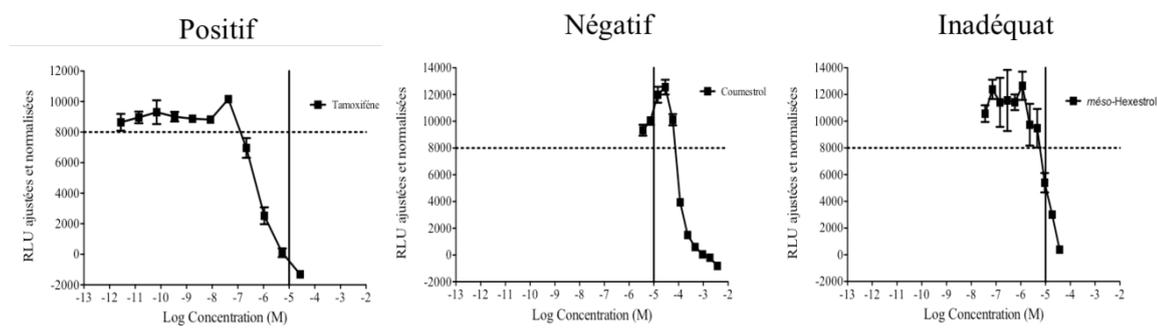
40. Les résultats positifs sont caractérisés à la fois par l’amplitude de l’effet induit et par la concentration correspondant à cet effet, dans la mesure du possible. Des exemples de résultats positifs, négatifs et inadéquats sont présentés dans les graphiques 5 et 6.

Graphique 5 : Exemples de résultats positifs, négatifs et inadéquats



Les lignes horizontales en pointillés indiquent 20 % de la réponse de E2, soit 2 000 RLU (valeur ajustée et normalisée).

Graphique 6 : Exemples de résultats positifs, négatifs et inadéquats pour l’effet antagoniste



Les lignes horizontales en pointillés indiquent 80 % de la réponse du mélange Ral/E2, soit 8 000 RLU (valeur ajustée et normalisée).

Les lignes verticales pleines correspondent à 1.00×10^{-5} M. Une réponse est considérée comme positive quand elle est située en dessous de la barre des 8 000 RLU et à des concentrations inférieures à 1.00×10^{-5} M. Les concentrations indiquées par un astérisque dans le graphique du méso-hexestrol ont donné lieu à un score de viabilité d’au moins 2.

Les résultats de l’essai du méso-hexestrol sont jugés inadéquats car la seule réponse inférieure à 8 000 RLU correspond à une concentration de 1.00×10^{-5} M.

41. On peut faire appel à la fonction de Hill à quatre paramètres pour calculer la CE_{50} et la CI_{50} [voir les protocoles pour les effets agoniste et antagoniste (7) pour plus de détails]. Le respect des critères d’acceptabilité indique que le système d’essai fonctionne correctement, mais ne garantit pas que chaque essai fournisse des données exactes. Dupliquer les résultats du premier essai constitue la meilleure garantie que les données obtenues sont correctes (voir le paragraphe 19 de « ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D’ESSAI DE TA ER » - pages 14 de cette Ligne directrice).

RAPPORT D'ESSAI

42. Voir le paragraphe 20 de « **ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE TA ER** » (pages 8-16 de cette Ligne directrice).

BIBLIOGRAPHIE(3)

- (1) ICCVAM. (2011). *ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists*, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (2) Monje P. et Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467-479.
- (3) Pujol P. et al. (1998) Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367-5373.
- (4) Weihua Z. et al. (2000). Estrogen Receptor (ER) β , a Modulator of ER α in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-941.
- (5) Balls M. et al. (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23(Suppl), p. 270-273.
- (6) Coecke S. et al. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*. 33: p. 261-287.
- (7) ICCVAM. (2011). *ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals*, NIH Publication (No. 11-7850.).
- (8) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13(1):67-82.
- (9) Escande A. et al. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459-69.
- (10) Thorne N., Ingleseand J.et Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*, 17(6):646-57.
- (11) Kuiper G.G. et al. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta”, *Endocrinology*, 139(10):4252-63.
- (12) Geisinger, et al. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
- (13) Baldwin, et al. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth in vitro, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.

- (14) Li, Y., et al. (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
- (15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

ANNEXE 4**Essai de transactivation faisant intervenir le récepteur des œstrogènes alpha humain transfecté de façon stable pour la détection de l'activité œstrogénique agoniste et antagoniste des produits chimiques à l'aide de la lignée cellulaire ER α CALUX**

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES (Voir aussi **INTRODUCTION GÉNÉRALE**, page 1)

1. L'essai de transactivation faisant intervenir la lignée cellulaire ER α CALUX s'appuie sur la lignée cellulaire humaine U2OS pour identifier les produits chimiques présentant une activité œstrogénique agoniste médiée par le récepteur des œstrogènes alpha humain (hER α). L'étude de validation de l'essai faisant intervenir la lignée cellulaire ER α CALUX transfectée de façon stable effectuée par *BioDetection Systems BV* (Amsterdam, Pays-Bas) a démontré la pertinence et la fiabilité de l'essai aux fins prévues (1). La lignée cellulaire ER α CALUX exprime uniquement le récepteur des œstrogènes ER α humain transfecté de façon stable (2) (3).
2. Cette méthode d'essai est conçue spécifiquement pour détecter la transactivation médiée par hER α avec la bioluminescence comme paramètre de mesure. La bioluminescence est utilisée couramment dans les essais en raison de son rapport signal/bruit élevé (4).
3. Des concentrations de phytoœstrogènes supérieures à 1 μ M ont été rapportées comme entraînant une suractivation du gène rapporteur luciférase, induisant des signaux de luminescence non médiés par le récepteur (5) (6) (7). Par conséquent, des concentrations plus élevées de phytoœstrogènes ou d'autres composés similaires qui peuvent suractiver l'expression de la luciférase doivent être examinées attentivement dans les essais de transactivation faisant intervenir le récepteur des œstrogènes transfecté de façon stable (voir annexe 2).
4. Il convient de consulter l'« INTRODUCTION GÉNÉRALE » et les « ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE LA TA ER » (pages 1-15) avant de mettre en œuvre la présente méthode à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette Ligne directrice sont indiquées à l'annexe 1.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI (Voir aussi **INTRODUCTION GÉNÉRALE**, page 1)

5. Cet essai sert à indiquer la formation d'une liaison entre ER et ligand et la translocation ultérieure du complexe récepteur-ligand ainsi formé vers le noyau. Dans le noyau, le complexe récepteur-ligand se fixe à certains éléments de réponse de l'ADN et transactive un gène rapporteur luciférase de luciole, induisant une augmentation de l'expression cellulaire de l'enzyme luciférase. Après ajout, le substrat de la luciférase (luciférine) se transforme en un produit bioluminescent. La lumière produite est facilement détectable et quantifiable à l'aide d'un luminomètre.

6. Ce système d'essai utilise des cellules ER α CALUX transfectées de façon stable. Les cellules

ER α CALUX proviennent de la lignée de cellules humaines U2OS ostéoblastiques d'ostéosarcome. Les cellules humaines U2OS ont été transfectées de manière stable avec 3xHRE-TATA-Luc et pSG5-neo-hER α à l'aide du procédé de co-précipitation par adjonction de phosphate de calcium. La lignée cellulaire U2OS a été considérée comme le meilleur candidat et donc choisie pour servir de lignée cellulaire rapporteur sensible aux œstrogènes (et à d'autres hormones stéroïdiennes) car elle présente une activité faible voire nulle du récepteur endogène. L'absence de récepteur endogène a été évaluée en utilisant uniquement des plasmides rapporteurs de la luciférase qui n'ont pas présenté d'activité lors de l'ajout du récepteur-ligand. En outre, cette lignée cellulaire soutenait de fortes réponses à médiation hormonale lors de l'introduction transitoire de récepteurs apparentés (2) (3) (8).

7. L'essai de produits chimiques pour la détection de l'activité œstrogénique ou anti-œstrogénique à l'aide de la lignée cellulaire ER α CALUX comprend une épreuve de présélection et des épreuves complètes. Pendant l'épreuve de présélection, la solubilité, la cytotoxicité et une gamme de concentrations affinée des produits chimiques d'essai aux fins d'essais complets sont déterminées. Pendant les épreuves complètes, les gammes de concentrations affinées de produits chimiques sont testées dans l'essai faisant intervenir la lignée cellulaire ER α CALUX ; ensuite, la classification des produits chimiques d'essai est établie pour leur activité agoniste ou antagoniste.

8. Les critères d'interprétation des résultats sont décrits en détail au paragraphe 59. En résumé, un produit chimique d'essai est considéré comme positif pour l'activité agoniste si au moins deux concentrations consécutives de ce produit provoquent une réponse supérieure ou égale à 10 % de la réponse maximale de l'étalon de référence 17 β -œstradiol (TP₁₀). Un produit chimique d'essai est considéré comme positif pour l'activité antagoniste si au moins deux concentrations consécutives de ce produit provoquent une réponse inférieure ou égale à 80 % de la réponse maximale de l'étalon de référence tamoxifène (TP₈₀).

PROCÉDURE

Lignées cellulaires

9. La lignée cellulaire U2OS ER α CALUX transfectée de façon stable est utilisée dans cet essai. Cette lignée peut être obtenue auprès de *BioDetection Systems BV* (Amsterdam, Pays-Bas) sous accord de licence technique.

10. Seules des cultures de cellules exemptes de mycoplasme sont utilisées. Les lots de cellules utilisés sont certifiés négatifs en ce qui concerne la contamination par des mycoplasmes, ou bien un test de détection des mycoplasmes est effectué avant utilisation. La RT-TPR (réaction en chaîne par polymérase en temps réel) est utilisée pour une détection sensible des infections à mycoplasmes (9).

Stabilité de la lignée cellulaire

11. Afin de préserver leur stabilité et leur intégrité, il convient de stocker les cellules CALUX dans de l'azote liquide (-80°C). Après décongélation de cellules pour lancer une nouvelle culture, les cellules sont mises en culture secondaire au moins deux fois avant d'être utilisées pour l'évaluation de l'activité œstrogénique agoniste et antagoniste des produits chimiques. Les cellules ne sont plus cultivées au-delà de 30 passages.

12. Pour contrôler la stabilité de la lignée cellulaire au fil du temps, la réactivité du système d'essai agoniste et antagoniste est vérifiée par l'évaluation de la CE_{50} ou de la CI_{50} de l'étalon de référence. De plus, l'induction relative de l'échantillon témoin positif (TP) et de l'échantillon témoin négatif (TN) est contrôlée. Les résultats doivent répondre aux critères d'acceptation de l'essai $ER\alpha$ CALUX en ce qui concerne l'activité agoniste (tableau 3C) et l'activité antagoniste (tableau 4C). Les étalons de référence, les témoins positifs et les témoins négatifs figurent dans les tableaux 1 (activité agoniste) et 2 (activité antagoniste).

Conditions de dépôt et de culture des cellules

13. Les cellules U2OS sont cultivées dans un milieu de culture [milieu DMEM/F12 (1:1) avec rouge de phénol comme indicateur de pH, complété par sérum bovin fœtal (7.5 %), acides aminés non essentiels (1 %), 10 unités/mL de pénicilline, streptomycine et généticine (G-418) comme marqueur de sélection]. Les cellules sont placées dans un incubateur de CO_2 (5 % de CO_2) à $37^{\circ}C$ et à 100 % d'humidité. Lorsque les cellules atteignent 85-95 % de la confluence, elles sont soit mises en culture secondaire soit préparées pour l'ensemencement dans des plaques microtitres 96 puits. Dans le deuxième cas de figure, les cellules sont remises en suspension à la concentration de 1×10^5 cellules/mL dans le milieu d'essai exempt d'œstrogènes [milieu DMEM/F12 (1:1) sans rouge de phénol, complété par sérum bovin fœtal traité au charbon enrobé de dextrane (5 % v/v), acides aminés non essentiels (1 % v/v), 10 unités/mL de pénicilline et streptomycine] et cultivées dans les puits des plaques microtitres 96 puits (100 μ L de suspension cellulaire homogénéisée). Les cellules sont ensuite pré-incubées dans un incubateur de CO_2 (5 % de CO_2 , $37^{\circ}C$, 100 % d'humidité) pendant 24 heures avant l'exposition. Le matériel en plastique est exempt d'œstrogènes.

Critères d'acceptabilité

14. Les activités agoniste et antagoniste du/des produit(s) chimique(s) d'essai sont testées en série. Une série d'essais est composée de six plaques microtitres au maximum. Chaque série d'essais contient au moins une série complète de dilutions d'un étalon de référence, d'un échantillon témoin positif, d'un échantillon témoin négatif et de témoins contenant le solvant. Les figures 1 et 2 illustrent l'agencement de la plaque pour la série d'essais agonistes et antagonistes.

15. Chaque dilution des étalons de référence, produits chimiques d'essai, témoins contenant le solvant, témoins positifs et témoins négatifs font l'objet d'analyses tripliquées. Chacune de ces analyses doit satisfaire aux exigences énoncées dans les tableaux 3A et 4A.

16. Une série complète de dilutions de l'étalon de référence (17 β -œstradiol pour l'activité agoniste ; tamoxifène pour l'activité antagoniste) est mesurée sur la première plaque dans chaque série d'essais. Aux fins de comparaison des résultats d'analyse des cinq autres plaques microtitres avec ceux de la première plaque microtitre contenant la courbe concentration-réponse complète de l'étalon de référence, toutes les plaques contiennent trois échantillons témoins : le témoin contenant le solvant, la plus forte concentration de l'étalon de référence testé et la CE_{50} (activité agoniste) ou CI_{50} (activité antagoniste) approximative de l'étalon de référence. Le ratio des échantillons témoins moyens de la première plaque et des cinq autres plaques doit satisfaire aux exigences énoncées dans le tableau 3C (activité agoniste) ou le tableau 4C (activité antagoniste).

17. Pour chacune des plaques microtitres d'une série d'essais, le facteur z est calculé (10). Le facteur z doit être calculé en utilisant les réponses à la plus haute et à la plus basse concentration de l'étalon de

référence Une plaque microtitre est considérée comme valide si elle satisfait aux exigences énoncées dans le tableau 3C (activité agoniste) ou le tableau 4C (activité antagoniste).

18. L'étalon de référence doit donner lieu à une courbe dose-réponse de forme sigmoïde. La CE_{50} ou CI_{50} dérivée de la réponse de la série de dilutions de l'étalon de référence doit satisfaire aux exigences énoncées dans le tableau 3C (activité agoniste) ou le tableau 4C (activité antagoniste).

19. Chaque série d'essais est composée d'un échantillon témoin positif et d'un échantillon témoin négatif. L'induction relative calculée à la fois sur la base de l'échantillon témoin positif et de l'échantillon témoin négatif doit répondre aux exigences énoncées dans le tableau 3C (activité agoniste) ou le tableau 4C (activité antagoniste).

20. Pendant toute la durée des mesures, le facteur d'induction de la plus forte concentration de l'étalon de référence est mesuré en divisant la plus forte réponse moyenne de l'étalon de référence 17β -œstradiol obtenue en unités relatives de lumière (URL) par la réponse moyenne du témoin contenant le solvant obtenue en URL. Ce facteur d'induction doit satisfaire aux exigences minimales relatives au facteur multiplicatif de l'augmentation de l'induction énoncées dans le tableau 3C (activité agoniste) et le tableau 4C (activité antagoniste).

21. Seules les plaques microtitres qui remplissent tous les critères d'acceptation susmentionnés sont considérées comme valides et peuvent être utilisées pour évaluer la réponse des produits chimiques d'essai.

22. Les critères d'acceptation sont applicables à la fois à l'épreuve de présélection et aux épreuves complètes.

Tableau 1 Concentrations de l'étalon de référence, du témoin positif (TP) et du témoin négatif (TN) pour l'essai CALUX de détection de l'activité agoniste

	Produit chimique	N° CAS	Plage d'essai (M)
Étalon de référence	17β -œstradiol	50-28-2	1.0×10^{-13} - 1.0×10^{-10}
Témoin positif (TP)	17α -méthyltestostérone	58-18-4	3.0×10^{-06}
Témoin négatif (TN)	corticostérone	50-22-6	1.0×10^{-08}

Tableau 2 Concentrations de l'étalon de référence, du témoin positif (TP) et du témoin négatif (TN) pour l'essai CALUX de détection de l'activité antagoniste

	Produit chimique	N° CAS	Plage d'essai (M)
Étalon de référence	tamoxifène	10540-29-1	3.0×10^{-09} - 1.0×10^{-05}
Témoin positif (TP)	4-hydroxytamoxifène	68047-06-3	1.0×10^{-09}
Témoin négatif (TN)	resvératrol	501-36-0	1.0×10^{-05}

Tableau 3 Critères d'acceptation pour l'essai ER α CALUX de détection de l'activité agoniste

A – échantillons individuels sur une plaque		critère
1	% maximum des ET des puits tripliqués (pour TN, TP, chaque dilution du produit chimique d'essai, l'étalon de référence, à l'exception de C0)	<15 %
2	% maximum des ET des puits tripliqués (pour l'étalon de référence et témoins contenant le solvant du produit chimique d'essai (C0, CS))	<30 %
3	Perte maximale de LDH, comme mesure de la cytotoxicité	<120 %
B – pour une seule plaque microtitre		
4	Ratio du témoin contenant le solvant de l'étalon de référence (C0 ; plaque 1) et du témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai (CS ; plaques de 2 à x)	0.5-2.0
5	Ratio de la CE ₅₀ appr. et des plus fortes concentrations de l'étalon de référence sur la plaque 1 et de la CE ₅₀ appr. et des plus fortes concentrations de l'étalon de référence sur les plaques de 2 à x (C4, C8)	0.70-1.30
6	Facteur z pour chaque plaque	>0.6
C – pour une seule série d'analyses (toutes les plaques appartenant à une même série)		
7	Courbe sigmoïde de l'étalon de référence	Oui (17 β -œstradiol)
8	Gamme de CE ₅₀ de l'étalon de référence 17 β -œstradiol	4*10 ⁻¹² – 4*10 ⁻¹¹ M
9	Facteur multiplicatif minimum de l'augmentation de l'induction de la plus forte concentration de 17 β -œstradiol, par rapport au témoin contenant le solvant de l'étalon de référence.	5
10	Induction relative (%) TP	> 30 %
11	Induction relative (%) TN	<10 %

Appr.: approximative ; TP : témoin positif ; TN : témoin négatif ; ET : écart-type ; CS : témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai ; C0 : témoin contenant le solvant de l'étalon de référence ; LDH : lactate déshydrogénase

Tableau 4 Critères d'acceptation pour l'essai ER α CALUX de détection de l'activité antagoniste

A – échantillons individuels sur une plaque		critère
1	% maximum des ET des puits tripliqués (pour TN, TP, chaque dilution du produit chimique d'essai, l'étalon de référence, témoin contenant le solvant (C0))	<15 %
2	% maximum des ET des puits tripliqués (pour témoin contenant le véhicule (TV) et concentration la plus forte de l'étalon de référence (C8))	<30 %
3	Perte maximale de LDH, comme mesure de la cytotoxicité	<120 %
B – pour une seule plaque microtitre		
4	Ratio du témoin contenant le solvant de l'étalon de référence (C0 ; plaque 1) et du témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai (CS ; plaques de 2 à x)	0.70-1.30
5	Ratio des CI ₅₀ appr. de l'étalon de référence sur la plaque 1 et des CI ₅₀ appr. de l'étalon de référence sur les plaques de 2 à x (C4)	0.70-1.30
6	Ratio des plus fortes concentrations de l'étalon de référence sur la plaque 1 et des plus fortes concentrations de l'étalon de référence sur les plaques de 2 à x (C8)	0.50-2.0
7	Facteur z pour chaque plaque	>0.6
C – pour une seule série d'analyses (toutes les plaques appartenant à une même série)		
8	Courbe sigmoïde de l'étalon de référence	oui (tamoxifène)
9	Gamme de CI ₅₀ de l'étalon de référence (tamoxifène)	1*10 ⁻⁸ - 1*10 ⁻⁷ M
10	Facteur multiplicatif minimum de l'augmentation de l'induction du témoin contenant le solvant de l'étalon de référence, par rapport à la plus forte concentration de tamoxifène.	2.5
11	Induction relative (%) TP	<70 %
12	Induction relative (%) TN	>85 %

Appr.: approximative ; TP : témoin positif ; TN : témoin négatif ; ET : écart-type ; TV : témoin contenant le véhicule ; CS : témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai ; C0 : témoin contenant le solvant de l'étalon de référence ; LDH : lactate déshydrogénase

Témoin contenant le véhicule/solvant, étalons de référence, témoins positifs, témoins négatifs

23. Les témoins contenant le véhicule/solvant, étalons de référence, témoins positifs et témoins négatifs utilisés sont identiques pour l'épreuve de présélection et les épreuves complètes. De plus, la concentration

des étalons de référence, des témoins positifs et des témoins négatifs est identique.

Témoin contenant le solvant

24. Le solvant utilisé pour dissoudre les produits chimiques d'essai est testé en tant que témoin contenant le solvant. Le diméthylsulfoxyde (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) a été utilisé comme véhicule lors de la validation de l'essai ER α CALUX. Si l'on fait appel à un autre solvant que le DMSO, l'ensemble des étalons de référence, des témoins et des produits chimiques est testé dans le même véhicule. Il convient de noter que, pour les études d'activité antagoniste, le témoin contenant le solvant contient une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste, le 17 β -œstradiol (environ la concentration CE₅₀). Pour tester le solvant utilisé pour les études d'activité antagoniste, un témoin contenant le véhicule est préparé et testé.

Témoin contenant le véhicule (antagonisme)

25. Pour les études d'activité antagoniste, le milieu d'essai est supplémenté avec une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste, le 17 β -œstradiol (environ la concentration CE₅₀). Pour tester le solvant utilisé pour dissoudre les produits chimiques d'essai pour l'activité antagoniste, il convient de préparer un milieu d'essai ne contenant pas de concentration fixe de l'étalon de référence agoniste (17 β -œstradiol). Cet échantillon témoin correspond au témoin contenant le véhicule. Le diméthylsulfoxyde (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) a été utilisé comme véhicule lors de la validation de l'essai ER α CALUX. Si l'on fait appel à un autre solvant que le DMSO, l'ensemble des étalons de référence, des témoins et des produits chimiques est testé dans le même véhicule.

Étalons de référence

26. L'étalon de référence utilisé dans l'essai de détection de l'activité agoniste est le 17 β -œstradiol (tableau 1). Les étalons de référence comprennent une série de dilutions de huit concentrations de 17 β -œstradiol ($1.0 \cdot 10^{-13}$, $3.0 \cdot 10^{-13}$, $1.0 \cdot 10^{-12}$, $3.0 \cdot 10^{-12}$, $6.0 \cdot 10^{-12}$, $1.0 \cdot 10^{-11}$, $3.0 \cdot 10^{-11}$, $1.0 \cdot 10^{-10}$ M).

27. L'étalon de référence utilisé dans l'essai de détection de l'activité antagoniste est le tamoxifène (tableau 2). Les étalons de référence comprennent une série de dilutions de huit concentrations de tamoxifène ($3.0 \cdot 10^{-09}$, $1.0 \cdot 10^{-08}$, $3.0 \cdot 10^{-08}$, $1.0 \cdot 10^{-07}$, $3.0 \cdot 10^{-07}$, $1.0 \cdot 10^{-06}$, $3.0 \cdot 10^{-06}$, $1.0 \cdot 10^{-05}$ M). Chacune des concentrations de l'étalon de référence antagoniste est co-incubée avec une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste 17 β -œstradiol ($3.0 \cdot 10^{-12}$ M).

Témoin positif

28. Le témoin positif pour les études d'activité agoniste est la 17 α -méthyltestostérone (tableau 1).

29. Le témoin positif pour les études d'activité antagoniste est le 4-hydroxytamoxifène (tableau 2). Le témoin positif antagoniste est co-incubé avec une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste 17 β -œstradiol ($3.0 \cdot 10^{-12}$ M).

Témoin négatif

30. Le témoin négatif pour les études d'activité agoniste est la corticostérone (tableau 1).

31. Le témoin négatif pour les études d'activité antagoniste est le resvératrol (tableau 2). Le témoin négatif antagoniste est co-incubé avec une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste 17 β -œstradiol ($3.0 \cdot 10^{-12}$ M).

Démonstration de la compétence du laboratoire (voir paragraphe 14 et tableaux 3 et 4 dans « **ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE TA ER** » de la présente Ligne directrice (pages 8-15)).

Véhicule

32. Le solvant utilisé pour dissoudre les produits chimiques d'essai solubilise complètement les produits testés, et est miscible avec le milieu cellulaire. Le DMSO, l'eau et l'éthanol (de 95 % à 100 % de pureté) sont des solvants appropriés. Si le DMSO est utilisé comme solvant, la concentration maximale de DMSO pendant l'incubation ne doit pas dépasser 1 % (v/v). Avant utilisation, le solvant est testé pour vérifier l'absence de cytotoxicité et d'interférences avec la performance des essais.

Préparation des étalons de référence, des témoins positifs, des témoins négatifs et des produits chimiques

33. Les étalons de référence, témoins positifs, témoins négatifs et produits chimiques sont dissous dans 100 % de DMSO (ou tout autre solvant approprié). Des dilutions (en série) appropriées sont ensuite préparées dans ce même solvant. Avant leur dissolution, l'ensemble des substances est amené à température ambiante. Les solutions-mères fraîchement préparées d'étalons de référence, de témoins positifs, de témoins négatifs et de produits chimiques d'essai ne doivent pas présenter de précipité ni de turbidité notables. Des solutions-mères d'étalons de référence et de témoins peuvent être préparées à l'avance. Des solutions-mères du produit chimique d'essai sont préparées extemporanément pour chaque expérience. Des dilutions finales des étalons de référence, témoins positifs et négatifs et produits chimiques sont préparées extemporanément pour chaque expérience et utilisées dans les 24 heures.

Solubilité, cytotoxicité et détermination de l'ordre de grandeur

34. Pendant l'épreuve de présélection, la solubilité des produits chimiques d'essai dans le solvant choisi est déterminée. Une solution-mère d'une concentration maximale de 0.1 M est préparée. Si cette concentration révèle des problèmes de solubilité, des solutions-mères de concentration inférieure sont préparées jusqu'à dissolution complète des produits chimiques d'essai. Pendant l'épreuve de présélection, des dilutions successives à 1:10 du produit chimique d'essai sont testées. La concentration maximale pour les essais agoniste et antagoniste est de 1 mM. À l'issue de l'épreuve de présélection, une gamme appropriée de concentrations affinées de produits chimiques est déduite et testée pendant les épreuves complètes. Les dilutions utilisées pour les épreuves complètes sont les suivantes : 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x et 3000x.

35. Des essais de cytotoxicité sont menés dans le cadre du protocole de la méthode d'essai agoniste et antagoniste (11). Ces essais de cytotoxicité sont menés à la fois durant l'épreuve de présélection et les épreuves complètes. La méthode utilisée pour évaluer la cytotoxicité lors de la validation de l'essai ER α CALUX combine l'essai de perte de lactate déshydrogénase (LDH) et l'inspection visuelle qualitative des cellules (voir appendice 1) après exposition aux produits chimiques d'essai. Cependant, il est possible d'avoir recours à d'autres méthodes quantitatives de détermination de la cytotoxicité (test colorimétrique au sel de tétrazolium MTT ou essai CALUX de cytotoxicité, par exemple). En général, les concentrations de produits chimiques induisant une réduction de plus de 20 % de la viabilité cellulaire sont considérées comme cytotoxiques et ne peuvent donc pas être utilisées pour l'évaluation des données. En ce qui concerne l'essai de perte de LDH, la concentration du produit chimique d'essai est considérée comme cytotoxique si la perte de LDH est supérieure à 120 %.

Exposition aux produits chimiques d'essai et organisation de la plaque d'essai

36. Après trypsinisation d'une fiole de cellules confluentes mises en culture, les cellules sont remises en suspension à la concentration de 1×10^5 cellules/mL dans le milieu d'essai exempt d'œstrogènes. Cent μL de cellules remises en suspension sont placées dans les puits intérieurs d'une plaque microtitre 96 puits. Les puits extérieurs sont remplis avec 200 μL de tampon phosphate salin (PBS) (voir figures 1 et 2). Les cellules des puits intérieurs sont ensuite pré-incubées dans un incubateur à CO_2 (5 % de CO_2 , 37°C , 100 % d'humidité) pendant 24 heures.

37. Après pré-incubation, les plaques font l'objet d'une inspection visuelle visant à détecter la cytotoxicité (voir appendice 1), la contamination et la confluence. Seules les plaques sans cytotoxicité ni contamination visibles et avec une confluence d'au moins 85 % sont utilisées pour les essais. Le milieu des puits intérieurs est soigneusement retiré et remplacé par 200 μL de milieu d'essai exempt d'œstrogènes contenant une série de dilutions appropriées de l'étalon de référence, du produit chimique d'essai, du témoin positif, du témoin négatif et du témoin contenant le solvant (tableau 5 : études de l'activité agoniste ; tableau 6 : études de l'activité antagoniste). Tous les étalons de référence, produits chimiques d'essai, témoins positifs, témoins négatifs et témoins contenant le solvant sont tripliqués. La figure 1 illustre l'agencement des plaques pour les essais agonistes. La figure 2 illustre l'agencement des plaques pour les essais antagonistes. L'agencement des plaques est identique pour l'épreuve de présélection et les épreuves complètes. Pour les essais antagonistes, tous les puits intérieurs, sauf ceux du témoin contenant le véhicule (TV), contiennent également une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste 17β -œstradiol (3.0×10^{-12} M). Notons que les étalons de référence C8 et C4 sont ajoutés à chaque plaque contenant le produit chimique d'essai.

38. Après exposition des cellules à tous les produits chimiques, les plaques microtitres 96 puits sont incubées de nouveau dans un incubateur à CO_2 (5 % de CO_2 , 37°C , 100 % d'humidité) pendant 24 heures.

Figure 1 Agencement des plaques microtitres 96 puits pour l'épreuve de présélection et l'évaluation de l'effet agoniste

Plaque 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TP	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TP	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TP	
E		TS	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TN	
F		TS	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TN	
G		TS	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TN	
H												

Plaques suivantes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		TS	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		TS	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		TS	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		TS	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (CE50)	
F		TS	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (CE50)	
G		TS	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (CE50)	
H												

- C0 = solvant de l'étalon de référence.
- C(1-8) = série de dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) de l'étalon de référence.
- PC = TP = témoin positif.
- NC = TN = témoin négatif.
- TCx-(1-8) = dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) du produit chimique d'essai pour l'épreuve de présélection et l'évaluation de l'effet agoniste du produit chimique d'essai x.
- SC = TS = témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai (de préférence le même solvant que C0, mais provenant éventuellement d'un autre lot).
- Cellules grisées = puits externes, remplis de 200µL de PBS.

Figure 2 Agencement des plaques microtitres 96 puits pour l'épreuve de présélection et l'évaluation de l'effet antagoniste

Plaques 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TV	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TV	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	TV	
E		TN	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TP	
F		TN	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TP	
G		TN	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TP	
H												

Plaques suivantes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		TS	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		TS	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		TS	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		C4 (C150)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (C150)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (C150)	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

- C0 = solvant de l'étalon de référence.
- C(1-8) = série de dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) de l'étalon de référence.
- PC = TP = témoin positif.
- NC = TN = témoin négatif.
- TCx-(1-8) = dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) du produit chimique d'essai pour l'épreuve de présélection et l'évaluation de l'effet antagoniste du produit chimique d'essai x.
- SC = TS = témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai (de préférence le même solvant que C0, mais provenant éventuellement d'un autre lot).
- VC = TV = témoin contenant le véhicule (témoin contenant le solvant mais ne contenant pas de concentration fixe de l'étalon de référence agoniste - 17β-œstradiol).
- Cellules grisées = puits externes, remplis de 200µL de PBS.

Note : Tous les puits intérieurs, sauf ceux du témoin contenant le véhicule (TV), contiennent également une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste 17β-œstradiol (3.0*10⁻¹² M).

Mesure de la luminescence

39. La mesure de luminescence est décrite en détail dans le protocole de la méthode d'essai agoniste et antagoniste (10). Le milieu des puits est retiré, et les cellules sont lysées après 24 heures d'incubation pour ouvrir la membrane cellulaire et permettre la mesure de l'activité de la luciférase.

40. La procédure de mesure de la luminescence nécessite un luminomètre à deux injecteurs. La réaction de la luciférase est déclenchée par injection de la luciférine (substrat de la luciférase). Cette même réaction est arrêtée par ajout de 0.2 M NaOH, afin d'empêcher le report de luminescence d'un puits à l'autre.

41. La lumière émise par chaque puits est exprimée en unités relatives de lumière (URL) par puits.

Épreuve de présélection

42. Les résultats de l'analyse de présélection servent à déterminer une gamme de concentrations affinées de produits chimiques testées pour les essais complets. L'évaluation des résultats de l'analyse de présélection et la détermination des gammes de concentrations affinées de produits chimiques d'essai pour les essais complets sont décrites en détail dans le protocole de la méthode d'essai agoniste et antagoniste (10). Les paragraphes suivants résument succinctement les procédures de détermination des gammes de concentrations affinées de produits chimiques d'essai pour les essais agoniste et antagoniste. Les tableaux 5 et 6 donnent des orientations sur la conception des dilutions en série.

Sélection des concentrations pour l'évaluation des effets agonistes

43. Pendant l'épreuve de présélection, les produits chimiques sont testés en utilisant la série de dilutions indiquée dans les tableaux 5 (activité agoniste) et 6 (activité antagoniste). Toutes les concentrations sont testées dans des puits tripliqués suivant l'agencement des plaques indiqué dans les figures 1 (activité agoniste) et 2 (activité antagoniste).

44. Seuls les résultats d'analyse qui remplissent les critères d'acceptation (tableau 3) sont considérés comme valables et peuvent être utilisés pour évaluer la réponse des produits chimiques d'essai. Les plaques microtitres qui ne remplissent pas les critères d'acceptation sont analysées de nouveau. Si la première plaque contenant la série complète de dilutions de l'étalon de référence ne remplit pas les critères d'acceptation, la série complète d'essais (six plaques) fait l'objet d'une nouvelle analyse.

45. Les gammes de concentrations initiales de produits chimiques d'essai sont ajustées, et l'épreuve de présélection est répétée si :

- une cytotoxicité est observée. L'épreuve de présélection est répétée avec des concentrations du produit chimique d'essai plus faibles, non cytotoxiques ;
- l'épreuve de présélection du produit chimique d'essai ne donne pas lieu à une courbe dose-réponse complète car les concentrations testées génèrent un niveau d'induction maximal. L'épreuve de présélection est répétée avec des concentrations plus faibles du produit chimique d'essai.

46. En cas d'observation d'une relation dose-réponse valide, la (plus faible) concentration à laquelle l'induction maximale est observée sans révéler de cytotoxicité est sélectionnée. La plus forte concentration du produit chimique à tester dans les épreuves complètes est trois fois supérieure à la concentration sélectionnée.

47. Une série affinée complète de dilutions du produit chimique est préparée suivant les étapes de dilution indiquées dans le tableau 5, en commençant par la plus forte concentration tel que susmentionné.

48. Si un produit chimique ne provoque pas d'effets agonistes, il est testé dans les épreuves complètes en commençant par la plus forte concentration non cytotoxique identifiée durant l'épreuve de présélection.

Sélection des concentrations pour l'évaluation des effets antagonistes

49. Seuls les résultats d'analyse qui remplissent les critères d'acceptation (tableau 4) sont considérés comme valables et peuvent être utilisés pour évaluer la réponse des produits chimiques d'essai. Les plaques microtitres d'une série d'analyses qui ne remplissent pas les critères d'acceptation sont analysées de nouveau. Si la première plaque contenant la série complète de dilutions de l'étalon de référence ne remplit pas les critères d'acceptation, la série complète d'essais (six plaques) fait l'objet d'une nouvelle analyse.

50. Les gammes de concentrations initiales de produits chimiques d'essai sont ajustées, et l'épreuve de présélection est répétée si :

- une cytotoxicité est observée. L'épreuve de présélection est répétée avec des concentrations du produit chimique d'essai plus faibles, non cytotoxiques ;
- l'épreuve de présélection du produit chimique d'essai ne donne pas lieu à une courbe dose-réponse complète car les concentrations testées génèrent un niveau d'inhibition maximal. L'épreuve de présélection est répétée avec des concentrations plus faibles du produit chimique d'essai.

51. En cas d'observation d'une relation dose-réponse valide, la (plus faible) concentration à laquelle l'inhibition maximale est observée sans révéler de cytotoxicité est sélectionnée. La plus forte concentration du produit chimique à tester dans les épreuves complètes est trois fois supérieure à la concentration sélectionnée.

52. Une série affinée complète de dilutions du produit chimique est préparée suivant les étapes de dilution indiquées dans le tableau 6, en commençant par la plus forte concentration tel que susmentionné.

53. Si un produit chimique ne provoque pas d'effets antagonistes, il est testé dans les épreuves complètes en commençant par la plus forte concentration non cytotoxique testée durant l'épreuve de présélection.

Épreuves complètes

54. À l'issue de la sélection des gammes de concentrations affinées, les produits chimiques sont testés de manière exhaustive en utilisant la série de dilutions indiquée dans les tableaux 5 (activité agoniste) et 6 (activité antagoniste). Toutes les concentrations sont testées dans des puits tripliqués selon l'agencement des plaques indiqué à la figure 1 (activité agoniste) et 2 (activité antagoniste).

55. Seuls les résultats d'analyse qui remplissent les critères d'acceptation (tableaux 3 et 4) sont considérés comme valables et peuvent être utilisés pour évaluer la réponse des produits chimiques d'essai. Les plaques microtitres qui ne remplissent pas les critères d'acceptation sont analysées de nouveau. Si la première plaque contenant la série complète de dilutions de l'étalon de référence ne remplit pas les critères d'acceptation, la série complète d'essais (six plaques) fait l'objet d'une nouvelle analyse.

Tableau 5 Concentration et dilutions des étalons de référence, des témoins et des produits chimiques utilisés pour les essais agonistes

Conc. (M) de l'étalon de référence 17β-œstradiol		Dilution du TCx durant l'épreuve de présélection		Dilution du TCx durant les épreuves complètes		Conc. (M) des témoins	
C0	0	TCx-1	10000000 x	TCx-1	3000 x	TP	3.0*10 ⁻⁰⁶
C1	1.0*10 ⁻¹³	TCx-2	1000000 x	TCx-2	1000 x	TN	1.0*10 ⁻⁰⁸
C2	3.0*10 ⁻¹³	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1.0*10 ⁻¹²	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	TS	0
C4	3.0*10 ⁻¹²	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	6.0*10 ⁻¹²	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1.0*10 ⁻¹¹	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3.0*10 ⁻¹¹	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1.0*10 ⁻¹⁰						

TCx - produit chimique d'essai x

TP - témoin positif (17α-méthyltestostérone)

TN - témoin négatif (corticostérone)

C0 - témoin contenant le solvant de l'étalon de référence

TS - témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai

Tableau 6 Concentration et dilutions des étalons de référence, des témoins et des produits chimiques utilisés pour les essais antagonistes

Conc. (M) de l'étalon de référence tamoxifène		Dilution du TCx durant l'épreuve de présélection		Dilution du TCx durant les épreuves complètes		Conc. (M) des témoins	
C0	0	TCx-1	10000000 x	TCx-1	3000 x	TP	1.0*10 ⁻⁰⁹
C1	3.0*10 ⁻⁰⁹	TCx-2	1000000 x	TCx-2	1000 x	TN	1.0*10 ⁻⁰⁵
C2	1.0*10 ⁻⁰⁸	TCx-3	100000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	3.0*10 ⁻⁰⁸	TCx-4	10000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	1.0*10 ⁻⁰⁷	TCx-5	1000 x	TCx-5	30 x		
C5	3.0*10 ⁻⁰⁷					Conc. (M) de l'étalon de référence agoniste	
C6	1.0*10 ⁻⁰⁶	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
		TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3.0*10 ⁻⁰⁶					17β-œstradiol	3.0*10 ⁻¹²
C8	1.0*10 ⁻⁰⁵	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		

TCx - produit chimique d'essai x

TP - témoin positif (4-hydroxytamoxifène)

TN - témoin négatif (resvératrol)

C0 - témoin contenant le solvant de l'étalon de référence

TS - témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai

TV - témoin contenant le véhicule [ne contient pas une concentration fixe de l'étalon de référence 17β-œstradiol utilisé pour la détection de l'activité agoniste (3.0*10⁻¹² M)]

Collecte et analyse des données

56. À l'issue de l'épreuve de présélection et des épreuves complètes, les valeurs CE_{10} , CE_{50} , TP_{10} , TP_{50} et l'induction maximale ($TC_{x_{max}}$) d'un produit chimique sont déterminées pour les essais agonistes. Pour les essais antagonistes, les valeurs CI_{20} , CI_{50} , TP_{80} , TP_{50} et l'induction minimale ($TC_{x_{min}}$) sont calculées. Les figures 3 (activité agoniste) et 4 (activité antagoniste) illustrent ces paramètres. Ces derniers sont calculés sur la base de l'induction relative de chaque produit chimique d'essai [par rapport à l'induction maximale de l'étalon de référence (=100 %)]. Une courbe de régression non linéaire (pente variable, quatre paramètres) est utilisée aux fins d'évaluation des données d'après l'équation ci-après :

$$y = Base + \frac{(Sommet - Base)}{(1 + 10^{((LogCE_{50} - x) * Pente\ de\ Hill)})}$$

X =	Log de la dose ou concentration	LogCE ₅₀ =	Logarithme de la concentration correspondant à la réponse située à mi-chemin entre la base et le sommet
Y =	réponse (induction relative (%))		
Sommet =	induction maximale (%)		
Base =	induction minimale (%)	Pente de Hill =	pente de la courbe

57. Les données brutes livrées par le luminomètre, exprimées en unités relatives de lumière (URL), sont transférées vers la feuille d'analyse des données conçue pour l'épreuve de présélection et les épreuves complètes. Les données brutes doivent remplir les critères d'acceptation des tableaux 3A, 3B (activité agoniste) et 4A, 4B (activité antagoniste). Si les données brutes remplissent les critères d'acceptation, les étapes de calculs ci-après sont effectuées en vue de la détermination des paramètres requis :

Activité agoniste

- Soustraire les URL moyennes du témoin contenant le solvant de l'étalon de référence des données brutes relatives aux étalons de référence.
- Soustraire les URL moyennes du témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai des données brutes relatives aux produits chimiques d'essai.
- Calculer l'induction relative de chaque concentration de l'étalon de référence, 100 % correspondant à la concentration maximale de l'étalon de référence.
- Calculer l'induction relative de chaque concentration de produit chimique d'essai, 100 % correspondant à la concentration maximale de l'étalon de référence.
- Évaluer les résultats d'analyse suivant une courbe de régression non linéaire (pente variable, quatre paramètres).
- Déterminer les valeurs CE_{50} et CE_{10} de l'étalon de référence.
- Déterminer les valeurs CE_{50} et CE_{10} des produits chimiques d'essai.
- Déterminer l'induction relative maximale du produit chimique d'essai (TC_{max}).
- Déterminer les valeurs TP_{10} et TP_{50} des produits chimiques d'essai.

En ce qui concerne les produits chimiques d'essai, il n'est pas toujours possible d'obtenir une courbe dose-réponse complète en raison de problèmes de cytotoxicité ou de solubilité, par exemple. En conséquence, les valeurs CE_{50} , CE_{10} et TP_{50} ne peuvent alors pas être déterminées. Dans ce cas, seules les valeurs TP_{10} et TC_{max} peuvent être déterminées.

Activité antagoniste

- Soustraire les URL moyennes de la concentration maximale d'étalon de référence des données brutes relatives aux étalons de référence.
- Soustraire les URL moyennes de la concentration maximale d'étalon de référence des données brutes relatives aux produits chimiques d'essai.
- Calculer l'induction relative de chaque concentration de l'étalon de référence, 100 % correspondant à la concentration maximale de l'étalon de référence.
- Calculer l'induction relative de chaque concentration de produit chimique d'essai, 100 % correspondant à la concentration maximale de l'étalon de référence.
- Évaluer les résultats d'analyse suivant une courbe de régression non linéaire (pente variable, quatre paramètres).
- Déterminer les valeurs CI_{50} et CI_{20} de l'étalon de référence.
- Déterminer les valeurs CI_{50} et CI_{20} des produits chimiques d'essai.
- Déterminer l'induction relative minimale du produit chimique d'essai (TC_{min}).
- Déterminer les valeurs TP_{80} et TP_{50} des produits chimiques d'essai.

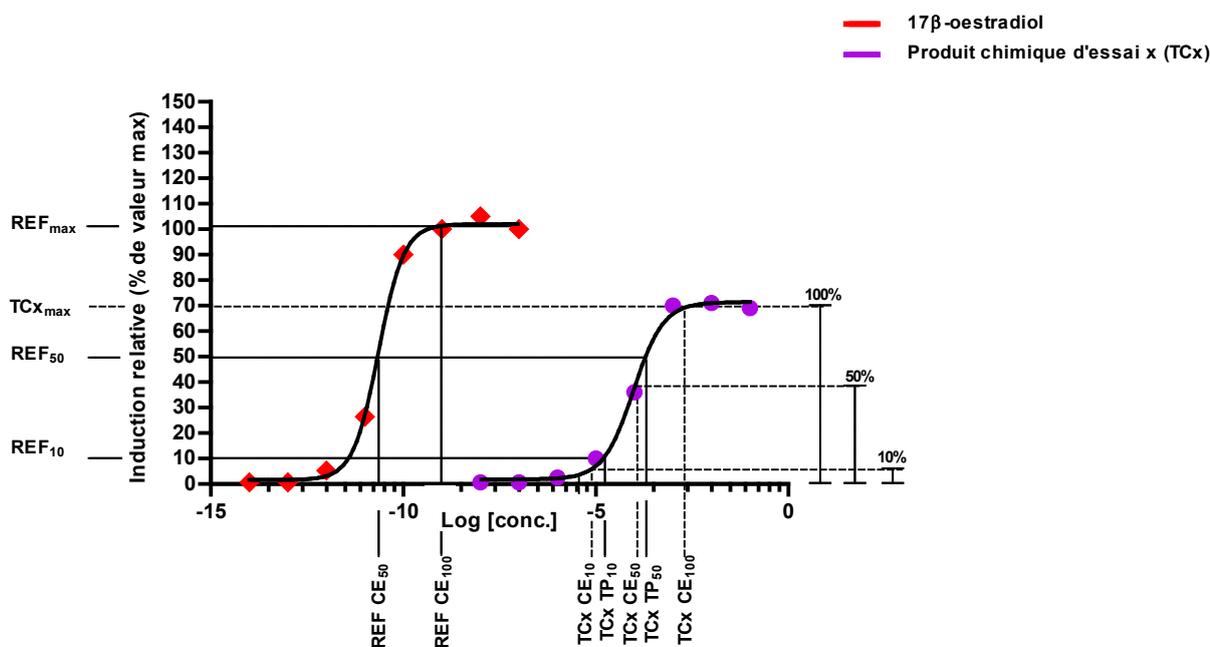


Figure 3 Vue d'ensemble des paramètres déterminés dans l'essai agoniste

- CE_{10} = concentration de substance à laquelle 10 % de la réponse maximale est observée.
- CE_{50} = concentration de substance à laquelle 50 % de la réponse maximale est observée.
- TP_{10} = concentration de produit chimique d'essai équivalant à la CE_{10} de l'étalon de référence.
- TP_{50} = concentration de produit chimique d'essai équivalant à la CE_{50} de l'étalon de référence.
- TCx_{max} = induction relative maximale du produit chimique d'essai.

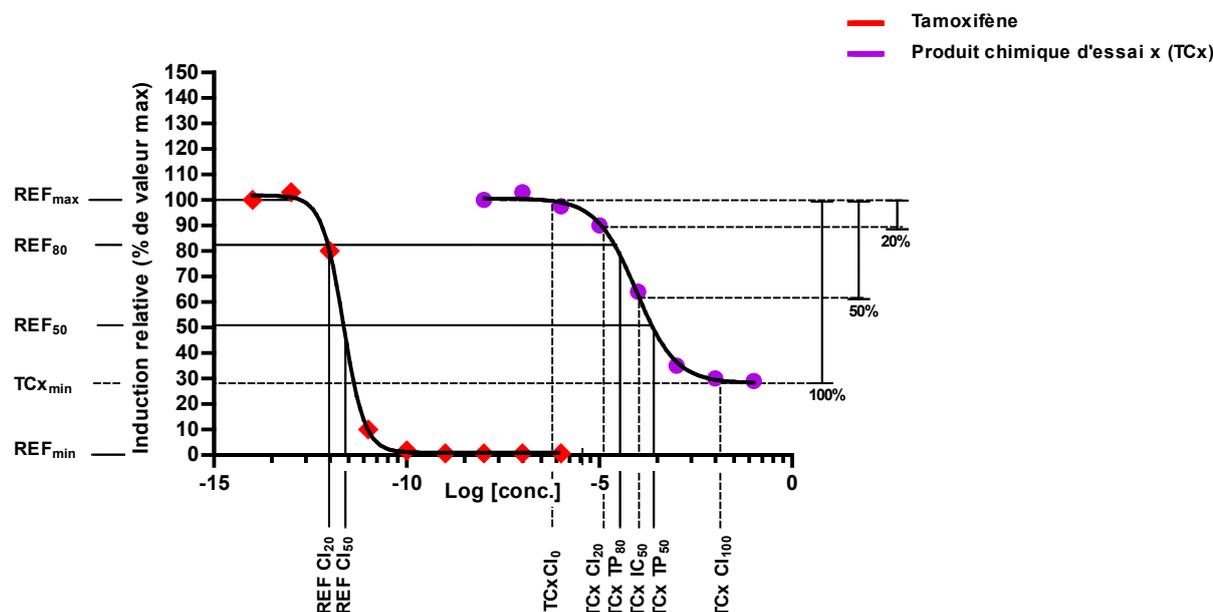


Figure 4 Vue d'ensemble des paramètres déterminés dans l'essai antagoniste

CI_{20}	=	concentration de substance à laquelle 80 % de la réponse maximale est observée (20 % d'inhibition).
CI_{50}	=	concentration de substance à laquelle 50 % de la réponse maximale est observée (50 % d'inhibition).
TP_{80}	=	concentration de produit chimique d'essai équivalant à la CI_{20} de l'étalon de référence.
TP_{50}	=	concentration de produit chimique d'essai équivalant à la CI_{50} de l'étalon de référence.
TC_{min}	=	induction relative minimale du produit chimique d'essai

En ce qui concerne les produits chimiques d'essai, il n'est pas toujours possible d'obtenir une courbe dose-réponse complète en raison de problèmes de cytotoxicité ou de solubilité, par exemple. En conséquence, les valeurs CI_{50} , CI_{20} et TP_{50} ne peuvent alors pas être déterminées. Dans ce cas, seules les valeurs TP_{20} et TC_{min} peuvent être déterminées.

58. Il convient de baser les résultats sur la réalisation de deux (ou trois) essais indépendants. Si deux essais donnent des résultats comparables et donc reproductibles, il n'est pas nécessaire de réaliser un troisième essai. Pour être acceptables, les résultats doivent :

- Remplir les critères d'acceptabilité (voir Critères d'acceptabilité paragraphes 14-22).
- Être reproductibles

Critères d'interprétation des données

59. Pour interpréter les données et décider si un produit chimique d'essai est considéré comme positif ou négatif, les critères ci-après sont utilisés :

Activité agoniste

Pour chaque épreuve complète, un produit chimique d'essai est considéré comme **positif** si :

- 1 la TC_{max} est supérieure ou égale à 10 % de la réponse maximale de l'étalon de référence (REF_{10}) ;
- 2 au moins deux concentrations consécutives du produit chimique d'essai sont supérieures ou égales à la REF_{10} .

Pour chaque épreuve complète, un produit chimique d'essai est considéré comme **négatif** si :

- 1 la TC_{max} ne dépasse pas 10 % de la réponse maximale de l'étalon de référence (REF_{10}) ;
- 2 moins de deux concentrations du produit chimique d'essai sont supérieures ou égales à la REF_{10} .

Activité antagoniste

Pour chaque épreuve complète, un produit chimique d'essai est considéré comme **positif** si :

- 1 la TC_{min} est inférieure ou égale à 80 % de la réponse maximale de l'étalon de référence ($REF_{80} = 20\%$ d'inhibition) ;
- 2 au moins deux concentrations consécutives du produit chimique d'essai sont inférieures ou égales à la REF_{80} .

Pour chaque épreuve complète, un produit chimique d'essai est considéré comme **négatif** si :

- 1 la TC_{min} est supérieure à 80 % de la réponse maximale de l'étalon de référence ($REF_{80} = 20\%$ d'inhibition) ;
- 2 moins de deux concentrations du produit chimique d'essai sont inférieures ou égales à la REF_{80} .

60. Aux fins de caractérisation de la réponse positive d'un produit chimique d'essai, l'amplitude de l'effet (activité agoniste : TC_{max} ; activité antagoniste : TC_{min}) et la concentration à laquelle l'effet se produit (activité agoniste : CE_{10} , CE_{50} , TP_{10} , TP_{50} ; activité antagoniste : CI_{20} , CI_{50} , TP_{80} , TP_{50}) sont consignées.

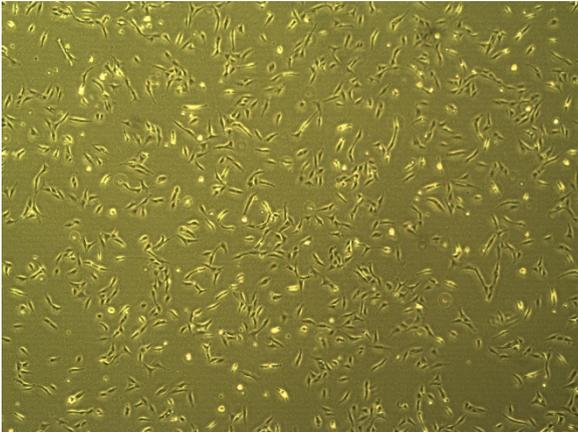
RAPPORT D'ESSAI

61. Voir le paragraphe 20 de « ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE TA ER » (Pages 8-14 de la présente ligne directrice)

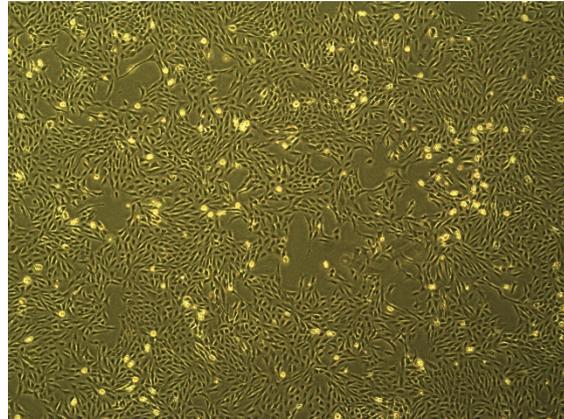
BIBLIOGRAPHIE(4)

1. OCDE (2016) Validation of the (anti-) ER α CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.240), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
2. Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.
3. Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT et van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2-OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through ER β . *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.
4. Thorne N, Inglese J et Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology* 17(6):646-57.
5. Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavallès V et Balaguer P. (2006), Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
6. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B et Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
7. Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204–211.
8. Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG et van der Burg B. (2006). Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173–187.
9. Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M et Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (TPR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.
10. Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Scr.*, 4, 67-73
11. Besselink H, Middelhof I et Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER α CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Pays-Bas.

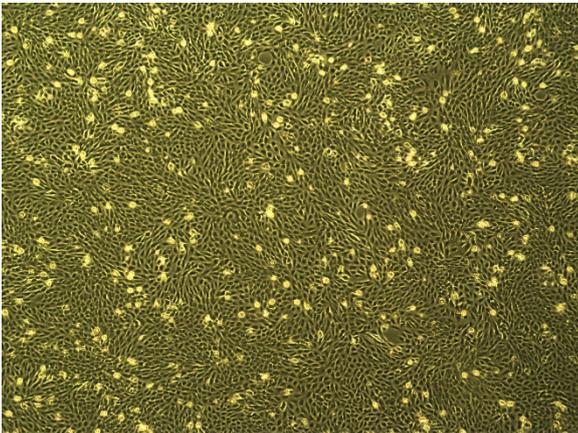
Annexe 1 : Inspection visuelle de la viabilité cellulaire



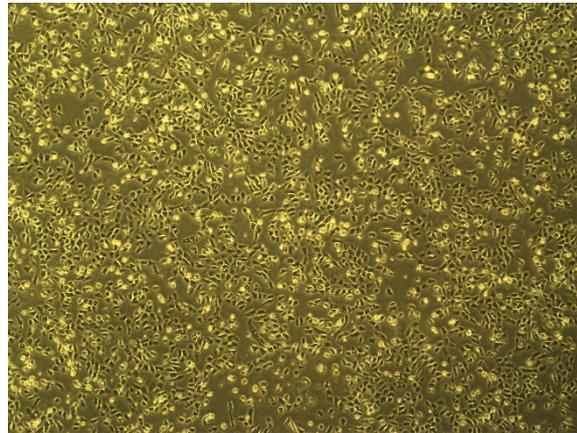
Confluence < 5 %. Les cellules viennent d'être ensemencées. Viabilité cellulaire de 100 %.
Classification : « absence de cytotoxicité »



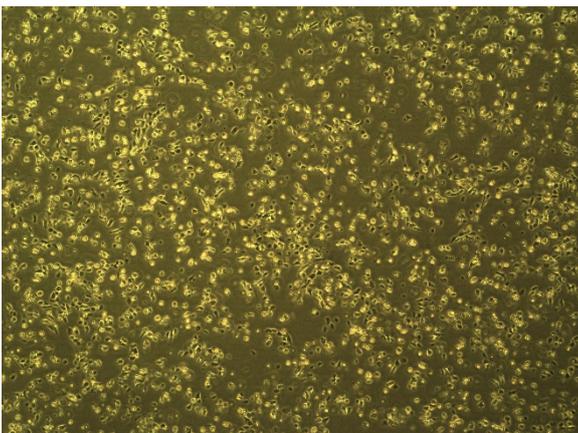
Confluence > 85 %. À ce stade, les cellules sont exposées aux produits chimiques. Viabilité cellulaire > 95 %.
Classification : « absence de cytotoxicité »



Confluence > 95 %. Les cellules sont densément organisées et commencent à proliférer. Viabilité cellulaire > 95 %.
Classification : « absence de cytotoxicité »



Viabilité cellulaire < 25 %. Les cellules commencent à se détacher, le contact entre les cellules diminue. Les cellules sont arrondies. Classification : « cytotoxicité »



Viabilité cellulaire < 5 %. Les cellules sont complètement détachées, le contact entre les cellules est rompu. Les cellules sont arrondies. Classification : « cytotoxicité »