

Bruxelles, le 25 février 2019
(OR. en)

6800/19
ADD 1

COMPET 206
ENV 212
CHIMIE 36
MI 195
ENT 53
SAN 104
CONSOM 77
EMPL 121
SOC 153

NOTE DE TRANSMISSION

Origine:	Commission européenne
Date de réception:	22 février 2019
Destinataire:	Secrétariat général du Conseil
N° doc. Cion:	Annexe du D060575/02
Objet:	Annexe du RÈGLEMENT (UE) .../... DE LA COMMISSION du XXX modifiant, aux fins de son adaptation au progrès technique, l'annexe du règlement (CE) n° 440/2008 établissant des méthodes d'essai conformément au règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH)

Les délégations trouveront ci-joint le document D060575/02 - Annexe.

p.j.: D060575/02 - Annexe

FR

ANNEXE

L'annexe du règlement ((CE) N° 440/2008 est modifiée comme suit:

(1) Dans la partie B, le chapitre B.4 est remplacé par le texte suivant the following:

«B.4 EFFET IRRITANT/CORROSIF AIGU SUR LA PEAU**INTRODUCTION**

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 404 (2015) de l'OCDE. Régulièrement mises à jour, les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques intègrent les meilleures données scientifiques disponibles. La révision de la ligne directrice 404 a porté plus particulièrement sur les possibilités d'améliorer le traitement des animaux de laboratoire et sur l'évaluation de toutes les informations existantes se rapportant aux produits chimiques testés en vue d'éviter les tests inutiles sur animaux. Cette nouvelle version de la ligne directrice 404 (initialement adoptée en 1981 et révisée en 1992, 2002 et 2015) comprend une référence au Document Guide sur les Approches Intégrées en matière d'Essai et d'Évaluation pour l'irritation et la corrosion de la peau (1). Ce Document Guide propose une approche modulaire pour les tests d'irritation et de corrosion de la peau. L'approche intégrée décrit plusieurs modules qui regroupent les sources d'information et les outils d'analyse, et fournit des guides sur la façon 1) d'intégrer et d'utiliser les informations existantes sur les données d'essai et autres données pour l'évaluation du potentiel irritant et corrosif pour la peau des produits chimiques testés, et 2) propose une approche dans les cas où des tests supplémentaires sont recommandés (1). La présente méthode d'essai recommande également d'opter, si cela s'avère nécessaire, pour une application successive plutôt que simultanée des trois timbres sur l'animal dans l'essai *in vivo* initial.
2. Les définitions de l'irritation et de la corrosion cutanées sont données en annexe à cette méthode d'essai.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

3. Pour assurer à la fois la fiabilité des résultats scientifiques et le bien-être animal, on ne procédera pas aux essais *in vivo* tant que toutes les données relatives au caractère éventuellement corrosif ou irritant pour la peau du produit chimique d'essai n'auront pas été évaluées au cours d'une analyse de leur valeur, telle que décrite dans le Document

Guide sur les Approches Intégrées en matière d'Essai et d'Évaluation pour l'irritation et la corrosion de la peau (1), c'est-à-dire selon chacune des trois parties de ce Guide et de chacun des modules correspondants. De façon concise, la partie 1 couvre les données existantes réparties dans sept modules comprenant les données humaines *in vivo*, les données *in vitro*, les propriétés physico-chimiques (par exemple le pH, en particulier s'il est fortement acide ou alcalin) et les données autres que provenant d'essais. La partie 2 comprend une analyse des données existantes. Si cette analyse ne permet pas de conclure, la partie 3 doit être mise en œuvre avec des essais supplémentaires, en partant des essais *in vitro*, étant donné que les essais *in vivo* ne seront considérés qu'en dernier ressort. Cette analyse doit donc permettre de diminuer le recours aux essais *in vivo* de l'effet corrosif ou irritant sur la peau des produits chimiques pour lesquels des études précédentes ont déjà livré suffisamment d'informations quant à ces deux aspects.

PRINCIPE DE L'ESSAI *IN VIVO*

4. Une seule dose du produit chimique d'essai est appliquée sur la peau de l'animal choisi pour l'expérience, les zones non traitées de la peau de l'animal servant de témoin. L'expérimentateur observe et note selon une échelle de valeurs le degré d'irritation ou de corrosion à intervalles déterminés, et le décrit de façon plus détaillée afin de fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets observés.
5. Les animaux qui manifestent des signes persistants de détresse et/ou de douleurs aiguës à n'importe quel stade de l'essai doivent être euthanasiés, et ces symptômes seront pris en compte dans l'évaluation du produit chimique d'essai. Les critères régissant la décision d'euthanasier les animaux moribonds et souffrants fortement sont exposés dans un autre document d'orientation (2).

PRÉPARATION DE L'ESSAI *IN VIVO*

Sélection de l'espèce animale

6. On choisira de préférence de jeunes adultes sains parmi les lapins albinos. L'utilisation d'une autre espèce sera justifiée, le cas échéant.

Préparation des animaux

7. Environ 24 heures avant l'essai, la région dorsale du tronc des animaux sera tondue à ras. On prendra soin de ne pas égratigner leur peau et seuls des animaux présentant une peau saine et intacte seront utilisés.
8. La fourrure de certaines souches de lapins est plus touffue par endroits et ce phénomène est plus marqué à certaines périodes de l'année. Ces plages à forte pilosité ne doivent pas recevoir la substance d'essai.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

9. Les animaux sont placés dans des cages individuelles. La température du local expérimental est réglée à 20°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) pour les lapins. Si l'humidité relative doit atteindre au moins 30 pour cent sans excéder de préférence 70 pour cent, en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 pour cent. On appliquera un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les lapins seront nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire et boiront de l'eau potable à volonté.

MODE OPÉRATOIRE

Application de la substance d'essai

10. Le produit chimique d'essai est appliqué sur une petite zone (environ 6 cm²) de la peau et recouverte par une compresse de gaze, assujettie au moyen d'un sparadrap non irritant. Si l'application directe est impossible (dans le cas de liquides ou de certaines pâtes, par exemple), le produit chimique d'essai est d'abord appliqué sur la compresse de gaze, laquelle est ensuite placée sur la peau. La compresse doit être maintenue en contact souple avec la peau à l'aide d'un pansement semi-occlusif durant la période d'exposition. Si le produit chimique d'essai est déposé sur la compresse, celle-ci doit être fixée sur la peau de façon à ce que le produit chimique soit réparti uniformément et entre bien en contact avec celle-ci. On fera en sorte que l'animal n'ait pas accès à la compresse et ne puisse ingérer ou inhaler le produit chimique d'essai.
11. Les produits chimiques liquides sont généralement testés à l'état non dilué. Si le produit chimique est solide (il peut être pulvérisé si nécessaire), il y a lieu de l'humidifier avec la plus petite quantité d'eau (ou au besoin d'un autre véhicule approprié) nécessaire à assurer un bon contact avec la peau. Lorsqu'on utilise un véhicule autre que l'eau, l'influence éventuelle du véhicule sur l'irritation de la peau par le produit chimique d'essai doit être minimale.
12. À la fin de la période d'exposition, qui dure normalement 4 heures, on enlève ce qui peut l'être du produit chimique d'essai restant, avec de l'eau ou un solvant approprié sans interférer avec la réaction ni altérer l'intégrité de l'épiderme.

Dose

13. Une dose de 0,5 ml de liquide ou de 0,5 g de solide ou de pâte est appliquée sur la plage à tester.

Essai initial (essai d'irritation/corrosion cutanée *in vivo* sur un seul animal)

14. Dès lors qu'un produit chimique d'essai est jugé corrosif, irritant ou non classé d'après l'analyse des données existantes ou d'essais *in vitro* préalables, tout essai sur animal

s'avère superflu. Toutefois, si l'on estime que des données supplémentaires sont nécessaires, le test *in vivo* est conduit initialement en utilisant un seul animal et en respectant la procédure suivante. Jusqu'à trois timbres d'essai sont appliqués successivement sur l'animal. Le premier timbre est enlevé après trois minutes. Si aucune réaction cutanée grave n'est constatée, un deuxième timbre est appliqué à un endroit différent et retiré après une heure. Si les observations effectuées à ce stade indiquent que l'exposition peut être étendue à quatre heures sans que cela fasse trop souffrir l'animal, l'expérimentateur appliquera un troisième timbre durant quatre heures et attribuera une cote à la réaction.

15. Si un effet corrosif est détecté à l'issue d'une des trois expositions séquentielles, l'essai s'achève immédiatement. Si aucun effet corrosif n'est relevé après l'enlèvement du troisième timbre, l'animal est gardé en observation durant 14 jours, à moins qu'un effet corrosif se déclare avant.
16. Dans les cas où l'on s'attend à ce que le produit chimique d'essai soit peut-être irritant, mais pas corrosif, un seul timbre sera appliqué sur un animal durant quatre heures.

Essai confirmatoire (essai d'irritation cutanée sur des animaux supplémentaires)

17. Si l'essai initial ne révèle aucun effet corrosif, il convient de confirmer la réaction irritante ou négative sur deux animaux supplémentaires, traités chacun avec un timbre maintenu durant quatre heures. Si l'essai initial produit un effet irritant, l'essai confirmatoire peut être conduit en mode séquentiel ou par l'exposition simultanée de deux animaux supplémentaires. Au cas exceptionnel où l'essai initial ne serait pas pratiqué, deux ou trois animaux peuvent être traités au moyen d'un seul timbre appliqué durant quatre heures. Si l'on utilise deux animaux et qu'ils expriment la même réaction, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. Dans le cas contraire, le troisième animal est également testé. L'utilisation d'animaux supplémentaires pourra être requise si les réactions sont équivoques.

Période d'observation

18. La durée de la période d'observation devrait être suffisante pour permettre d'évaluer complètement la réversibilité des effets observés. Il faudra cependant mettre fin à l'expérience dès que l'animal montre des signes persistants de douleur ou de détresse aiguës. La réversibilité des effets est déterminée par l'observation des animaux sur une période s'étendant jusqu'à 14 jours après l'enlèvement des timbres. Si la réaction s'avère réversible avant le quatorzième jour, l'expérience s'achève à ce moment-là.

Observations cliniques et cotation des réactions cutanées

19. L'observation des signes d'érythème et d'oedème chez tous les animaux et la cotation des réactions s'effectuent au bout de 60 minutes et ensuite 24, 48 et 72 heures après

l'enlèvement du timbre. S'agissant de l'animal du test initial, la plage soumise à l'épreuve est aussi examinée immédiatement après l'enlèvement du timbre. Les réactions cutanées sont cotées et consignées conformément à l'échelle figurant dans le tableau ci-dessous. Si la peau présente des lésions qui n'accusent pas l'irritation ou la corrosion après 72 heures, il pourra être nécessaire d'observer l'animal jusqu'au quatorzième jour afin de déterminer la réversibilité des effets. En plus de l'observation de l'irritation, tous les effets toxiques locaux, tels que le dégraissage de la peau, et tout effet systémique nocif (par exemple, des effets se manifestant par des signes cliniques de toxicité et sur le poids corporel) doivent être relevés et décrits en détail. L'examen histopathologique est à envisager au cas où il faut éclaircir des réactions équivoques.

20. La cotation des réactions cutanées est forcément subjective. L'harmonisation de la cotation des réactions cutanées et l'appui aux laboratoires d'essai ainsi qu'au personnel chargé d'effectuer et d'interpréter les observations passent par une formation adéquate des expérimentateurs au système de cotation utilisé (voir tableau ci-dessous). Un manuel illustré sur la cotation de l'irritation cutanée et d'autres lésions pourrait être utile (10).

RÉSULTATS ET RAPPORT

21. Les résultats de l'étude devraient être récapitulés dans un tableau joint au rapport d'essai final et couvrir tous les aspects énumérés au paragraphe 24.

Évaluation des résultats

22. Le degré d'irritation cutanée devrait être évalué conjointement avec la gravité des lésions et leur caractère réversible. Les cotes individuelles ne fournissent pas une valeur absolue des propriétés irritantes d'une substance, celles-ci étant évaluées parallèlement à d'autres effets de la substance. En revanche, les cotes individuelles doivent être considérées comme des valeurs de référence, à évaluer en combinaison avec toutes les autres observations effectuées au cours de l'étude.
23. L'évaluation des réactions d'irritation doit tenir compte de la réversibilité des lésions cutanées. Si des réactions, telles que l'alopecie (sur une aire limitée), l'hyperkératose, l'hyperplasie et la desquamation, persistent jusqu'à la fin de la période d'observation de 14 jours, il y a lieu de considérer le produit chimique d'essai comme irritant.

Rapport d'essai

24. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Justification de l'essai in vivo:

- analyse de la valeur des résultats disponibles avant l'essai, notamment des résultats de la démarche expérimentale séquentielle:

- - description des données pertinentes livrées par des essais précédents;
- - données obtenues à chaque étape de la démarche expérimentale;
- - description des essais *in vitro* effectués exposant le détail des procédures et les résultats obtenus avec les substances d'essai et de référence;
- - comment l'analyse de la valeur des résultats a débouché sur la décision de conduire l'étude *in vivo*.

Produit chimique d'essai:

- Substance mono-constituant: identification chimique, notamment désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent;
- Substance multi-constituants, substance de composition inconnue ou variable, produits réactionnels complexes et matériaux biologiques (UVCB) ou mélange: caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;
- - Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
- - Source et numéro de lot si disponible;
- - Traitement du produit chimique d'essai avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage);
- - Stabilité du produit chimique d'essai, date de péremption, ou date de vérification analytique si disponible;
- - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Véhicule:

- - identification, concentration (s'il y a lieu), volume utilisé;
- - justification du choix du véhicule.

Animaux d'expérience

- - espèce/souche utilisée, justification de l'utilisation éventuelle d'un animal autre que le lapin albinos;
- - nombre d'animaux de chaque sexe;
- - poids de chaque animal au début et à la fin de l'essai;
- - âge des animaux au début de l'essai;

- - source des animaux, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.

Conditions expérimentales:

- - technique de préparation du site d'application;
- - détails concernant la composition du timbre et la technique d'application de ce dernier;
- - détails sur la préparation, l'application et l'enlèvement du produit chimique d'essai.

Résultats:

- - tableau faisant apparaître, pour chaque animal et à chaque relevé, les cotes attribuées aux réactions d'irritation/corrosion observées;
- - description de toutes les lésions observées;
- - description circonstanciée de la nature et du degré d'irritation ou de corrosion observé, et de tout effet histopathologique;
- - description de tout autre effet local néfaste (par exemple le dégraissage de la peau) et des effets systémiques.

Discussion des résultats.

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 203.) Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (2) OCDE (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as Endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998
- (3) OCDE (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 19), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

TABLEAU: COTATION DES RÉACTIONS CUTANÉES**Formation d'érythème et d'escarre**

Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4
Maximum possible:	4

Formation d'oedème

Pas d'oedème	0
Oedème très léger (à peine perceptible)	1
Oedème léger (pourtour de la zone oedémateuse bien délimité par une enflure nette)	2
Oedème modéré (enflure d'environ 1 mm)	3
Oedème grave (enflure de plus de 1 mm s'étendant au-delà de l'aire exposée)	4
Maximum possible:	4

Un examen histopathologique pourra être conduit pour éclaircir des réactions douteuses.

Appendice

DÉFINITIONS

Produit chimique: une substance ou un mélange.

L'irritation cutanée: apparition de lésions cutanées réversibles consécutives à l'application d'un produit chimique d'essai durant une période de quatre heures au maximum.

La corrosion cutanée: survenue de lésions cutanées irréversibles, et plus précisément d'une nécrose visible à travers l'épiderme et dans le derme, à la suite de l'application d'un produit chimique d'essai durant une période de quatre heures au maximum. La corrosion cutanée se manifeste par des ulcères, des saignements, des croûtes saignantes et, au terme de la période d'observation de 14 jours, par une décoloration due au pâlissement de la peau, des zones d'alopécie totale et des escarres. On envisagera un examen histopathologique s'il faut élucider des lésions douteuses.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai»

(2) Dans la partie B, le chapitre B.17 est remplacé par le texte suivant:

«B.17 ESSAIS *IN VITRO* DE MUTATION GÉNIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRES UTILISANT LES GÈNES HPRT ET XPRT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 476 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les méthodes d'essai sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et du bien-être des animaux. La présente version révisée de la méthode d'essai B.17 reflète les connaissances scientifiques acquises après plus de trente années d'expérience de cet essai et résulte également des évolutions d'une nouvelle méthode d'essai distincte, consacrée aux essais *in vitro* de mutation génétique sur les cellules de mammifères menés en utilisant le gène TK (thymidine kinase). La méthode B.17 s'inscrit dans une série de méthodes d'essai sur la toxicologie génétique. L'OCDE a élaboré un document qui fournit des éléments d'information concis sur les essais de toxicologie génétique et donne un aperçu des récents changements qui ont été apportés aux lignes directrices de toxicité génétique de l'OCDE(1).
2. L'essai *in vitro* de mutation génétique sur les cellules de mammifères a pour objectif de détecter des mutations induites par des produits chimiques. Les lignées cellulaires utilisées dans ces essais mesurent les mutations directes dans les gènes rapporteurs, en particulier le gène endogène de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (Hprt pour les cellules de rongeur, HPRT pour les cellules humaines; collectivement désignés dans la présente méthode d'essai par gène Hprt et test HPRT), et le transgène de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (gpt) (dénommé test XPRT). Les tests de mutation HPRT et XPRT détectent différents éventails d'effets génétiques. Outre les mutations détectées par le test HPRT (substitutions d'une paire de base par une autre, décalages du cadre de lecture, petites délétions et insertions), l'emplacement autosomique du transgène gpt peut permettre de détecter des mutations résultant de délétions importantes et même d'une recombinaison mitotique, qui ne sont pas détectées par le test HPRT parce que le gène Hprt est situé sur le chromosome X (2) (3) (4) (5) (6) (7). À l'heure actuelle, le test XPRT est moins utilisé que le test HPRT à des fins réglementaires.

3. Les définitions des termes employés sont présentées à l'appendice1.

REMARQUES PRÉMINIMAIRES ET LIMITES

4. Les essais conduits *in vitro* requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique, mais celle-ci est incapable de reproduire parfaitement les conditions *in vivo*.

5. On prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de conduire à de faux résultats positifs (à savoir une possible interaction avec le système d'essai) non causés par une interaction directe entre le produit chimique d'essai et le matériel génétique de la cellule ; ces conditions peuvent être une modification du pH ou de l'osmolalité (8) (9) (10) une interaction avec les composants du milieu (11) (12) ou une cytotoxicité excessive (13). Une cytotoxicité supérieure aux plafonds recommandés tels que définis au paragraphe 19 est considérée comme excessive pour le test HPRT.
6. Avant d'utiliser la méthode d'essai sur un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si, et dans l'affirmative pourquoi, elle peut fournir des résultats acceptables dans ce cadre réglementaire. Cette vérification n'est pas nécessaire si l'essai du mélange répond à des exigences réglementaires.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des cellules mutantes déficientes en Hprt dans le test HPRT ou en xprt dans le test XPRT sont résistantes aux effets cytostatiques de la 6-thioguanine (TG), un analogue de la purine. Les cellules munies de l'enzyme Hprt (dans le test HPRT) ou du Gpt (dans le test XPRT) sont sensibles à la TG, qui entraîne une inhibition du métabolisme et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, des cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TG, tandis que des cellules normales qui contiennent l'enzyme Hprt (test HPRT) ou gpt (test XPRT), ne le peuvent pas.
8. Des cellules en suspension ou en culture monocouche sont exposées au produit chimique d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique (voir paragraphe 14), pendant une période appropriée (3-6 heures). Les cellules sont repiquées afin de déterminer la cytotoxicité et de laisser le phénotype s'exprimer avant la sélection des mutants (14) (15) (16) (17). On détermine la cytotoxicité en mesurant la survie relative (SR), à savoir l'efficacité de clonage mesurée immédiatement après le traitement et ajustée pendant le traitement en fonction d'une éventuelle perte cellulaire par rapport au témoin négatif (paragraphe 18 et appendice 2). Les cultures traitées sont maintenues dans un milieu de croissance pendant une période de temps suffisante, caractéristique de chaque type de cellule, afin de permettre une expression phénotypique quasi-optimale des mutations induites (habituellement 7-9 jours minimum). Une fois l'expression phénotypique obtenue, on détermine la fréquence des mutants en ensemencant avec un nombre connu de cellules un milieu contenant l'agent sélectif permettant de détecter les colonies de mutants. Dans un milieu exempt d'agent sélectif, on détermine l'efficacité de clonage (viabilité). Après un temps d'incubation approprié, les colonies sont comptées. On corrige le nombre de colonies de mutants de l'efficacité de clonage au moment de la sélection des mutants pour obtenir la fréquence des mutants.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Cellules

9. Les types de cellules utilisés pour les tests de mutation HPRT et XPRT doivent avoir une sensibilité prouvée aux mutagènes chimiques, une efficacité de clonage élevée, un caryotype stable et une fréquence stable de mutants spontanés. Les cellules les plus fréquemment utilisées pour le test HPRT incluent les lignées CHO, CHL et V79 de cellules de hamster chinois, L5178Y de cellules de lymphome de souris, et TK6 de cellules humaines lymphoblastoïdes (18) (19). Les cellules AS52 qui dérivent des lignées CHO et contiennent le transgène gpt (mais pas le gène Hprt) sont utilisées pour le test XPRT (20) (21); L'utilisation d'autres lignées cellulaires doit être justifiée et validée.
10. La stabilité du caryotype et l'absence de contamination par des mycoplasmes sont vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires (22) (23), et les cellules sont écartées si une contamination ou une modification du caryotype est constatée. La durée normale du cycle cellulaire utilisée dans le laboratoire d'essai doit être établie et doit correspondre aux caractéristiques cellulaires publiées. Il convient également de contrôler la fréquence de mutants spontanés dans le stock de cellules maîtresses, et ce stock ne devra pas être utilisé si la fréquence de mutants n'est pas acceptable.
11. Avant d'employer les cultures dans l'essai, il peut être nécessaire de les débarrasser des cellules mutantes qu'elles contiennent, par exemple en utilisant un milieu de culture HAT pour le test HPRT et MPA pour le test XPRT (5) (24) (voir l'[appendice 1](#)). Les cellules nettoyées peuvent être cryopréservées, puis décongelées pour servir de stocks de travail. Il est possible d'utiliser pour le test le stock de travail tout juste décongelé une fois atteints les temps de doublement normaux. Dans le cas d'un test XPRT, la culture de routine de cellules AS52 doit se faire dans des conditions qui assurent le maintien du transgène gpt (20).

Milieu et conditions de culture

12. Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂, et température d'incubation de 37 °C) appropriés pour les cultures. Les cultures cellulaires doivent toujours être maintenues dans des conditions qui garantissent leur croissance en phase exponentielle. Il est particulièrement important de choisir des milieux et des conditions de culture qui stimulent la croissance optimale des cellules pendant la période d'expression et l'efficacité optimale du clonage pour les cellules mutantes et non mutantes.

Préparation des cultures

13. Les lignées cellulaires sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans un milieu de culture à une densité telle que les cellules en suspension ou en monocouche poursuivront leur croissance de manière exponentielle pendant les périodes de traitement et

d'expression (il convient par exemple d'éviter que les cellules qui se multiplient en monocouche arrivent à confluence).

Activation métabolique

14. Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé, recommandé par défaut, sauf justification contraire, est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foies de rongeurs (généralement des rats) traités avec des inducteurs enzymatiques comme l'Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) ou un mélange de phénobarbital et β -naphthoflavone (29) (30) (31) (32). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (33) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Aroclor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (29) (31). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 2 % (v/v) mais peut être portée à 10 % v/v dans le milieu d'essai final. Le choix du type et de la concentration du système d'activation métabolique exogène ou de l'inducteur métabolique utilisé pourra dépendre de la classe des substances chimiques à tester (34) (35) (36).

Préparation du produit chimique d'essai

15. Les produits chimiques solides à tester sont dissous dans un solvant approprié puis, le cas échéant, dilués avant application (voir paragraphe 16). Avant le traitement, les produits chimiques liquides peuvent être ajoutés directement et/ou après dilution au système d'essai. Les produits gazeux ou volatils nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients de culture hermétiquement clos (37) (38). Il convient de préparer les produits chimiques d'essai juste avant le traitement, à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'ils peuvent être stockés.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Solvants

16. Le solvant doit être choisi de manière à optimiser la solubilité des produits chimiques d'essai, sans engendrer d'effets néfastes sur la conduite de l'essai, c'est-à-dire sans modifier la croissance cellulaire, nuire à l'intégrité du produit chimique testé, réagir avec les récipients de culture ou détériorer le système d'activation métabolique. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant (ou milieu de culture) aqueux chaque fois que cela est possible. L'eau et le diméthylsulfoxyde sont des exemples de solvants couramment utilisés. En règle générale, les solvants organiques ne doivent pas dépasser 1 % (v/v) et les solvants aqueux (salin ou eau) 10 % (v/v) dans le milieu de traitement final. L'emploi d'un solvant inhabituel (éthanol ou acétone, par exemple) doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité avec le produit chimique

d'essai et le système d'essai, ainsi que de son absence de génotoxicité aux concentrations utilisées. En l'absence de telles données, il est important d'ajouter dans l'essai des témoins non traités (voir l'appendice 1) afin de démontrer que le solvant choisi n'entraîne aucun effet délétère ou mutagène.

Mesure de la cytotoxicité cellulaire et choix des concentrations d'exposition

17. Lors de la détermination de la plus forte concentration de produit chimique testé, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 20), une précipitation dans le milieu de culture (voir paragraphe 21), ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (voir paragraphe 5). Si le produit chimique testé provoque une modification marquée du pH du milieu au moment de son ajout, il est possible d'ajuster le pH par tamponnage du milieu de traitement final de manière à éviter les faux résultats positifs et à maintenir des conditions de culture appropriées.
18. La concentration est sélectionnée en fonction de la cytotoxicité et d'autres considérations (voir paragraphes 20-22). Un essai préliminaire visant à évaluer la cytotoxicité peut s'avérer utile pour mieux cerner les concentrations à utiliser dans l'essai principal, mais il n'est pas obligatoire. Même si une évaluation initiale de la cytotoxicité a été effectuée, il reste indispensable de mesurer la cytotoxicité pour chaque culture dans le cadre de l'expérience principale. La cytotoxicité est évaluée au regard de la survie relative (SR), à savoir l'efficacité de clonage (EC) des cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement et fondée sur le nombre de cellules, par rapport à l'efficacité ajustée du clonage sur les témoins négatifs (à qui l'on a attribué une survie de 100 %) (voir les formules à l'appendice 2).
19. Il convient d'évaluer au moins quatre concentrations d'essai (sans compter les témoins positifs et les témoins avec solvant) remplissant les critères d'acceptabilité (cytotoxicité appropriée, nombre de cellules, etc.). Alors que l'utilisation de cultures en double exemplaires est recommandée, chacune des cultures réalisées en un seul ou plusieurs exemplaires peut être utilisée à chaque concentration d'essai. Les résultats obtenus pour chacune des répliques (cultures réalisées en plusieurs exemplaires) à une concentration donnée doivent faire l'objet de rapports distincts mais peuvent être regroupés pour l'analyse des données (17). Pour les produits chimiques dont la cytotoxicité est faible ou nulle, des niveaux de concentrations espacés d'un facteur de 2 à 3 environ conviendront généralement. En cas de cytotoxicité, les concentrations d'essai retenues doivent couvrir une plage englobant la concentration produisant une cytotoxicité et les concentrations pour lesquelles une cytotoxicité modérée, faible ou nulle est observée. De nombreux produits chimiques d'essai présentent des courbes concentration-réponse à forte pente et, afin de couvrir toute la plage de valeurs de la cytotoxicité ou pour étudier en détail la relation

concentration-réponse, il pourra s'avérer nécessaire d'utiliser des concentrations plus rapprochées et plus de quatre concentrations, notamment dans les cas où il est nécessaire de répéter l'expérience (voir paragraphe 43). Si l'on réalise des cultures en un seul exemplaire, il peut être particulièrement important d'utiliser plus de 4 concentrations.

20. Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une cytotoxicité comprise entre 20 et 10 % SR. Les résultats positifs présents uniquement à une SR inférieure ou égale à 10 % doivent être interprétés avec prudence (paragraphe 43).
21. Pour les produits chimiques d'essai peu solubles qui ne sont pas cytotoxiques à des concentrations inférieures à la concentration insoluble la plus faible, la plus forte concentration analysée doit produire une turbidité ou un précipité visible à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope inversé à la fin du traitement avec le produit chimique testé. Même si une cytotoxicité intervient au-delà de la concentration insoluble la plus faible, il est recommandé de tester une seule concentration produisant une turbidité ou un précipité visible, car de fausses réponses pourraient découler de ce précipité. À la concentration produisant un précipité, il convient de s'assurer que ce dernier n'interfère pas avec la conduite de l'essai. Il peut être utile de déterminer la solubilité dans le milieu de culture préalablement à l'essai.
22. Si aucun précipité ou aucune cytotoxicité limitante ne sont observés, la concentration d'essai maximale doit correspondre à la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (39) (40). Lorsque la composition du produit chimique testé n'est pas définie, par exemple dans le cas de substances de composition inconnue ou variable, de produits de réaction complexes ou de matériels biologiques (substances chimiques UVCB) (41), de produits extraits de l'environnement etc., il peut être nécessaire d'augmenter la concentration maximale (5 mg/ml par exemple), en absence de cytotoxicité suffisante, afin d'accroître la concentration de chacun des composants. Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (42).

Témoins

23. Des témoins négatifs concomitants (voir paragraphe 16), constitués uniquement du solvant dans le milieu de traitement et testés de la même façon que les cultures traitées, doivent être inclus pour chaque condition expérimentale.
24. Des témoins positifs concomitants sont nécessaires pour démontrer la capacité du laboratoire d'identifier les mutagènes dans les conditions du protocole d'essai utilisé, ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique exogène, le cas échéant. Le tableau 1 ci-dessous présente des exemples de témoins positifs. D'autres substances chimiques peuvent être utilisées comme témoins positifs, si cela est justifié. Étant donné que les essais *in vitro* de génotoxicité sur cellules de mammifères sont suffisamment normalisés,

les tests appliquant des traitements avec et sans activation métabolique exogène peuvent être menés en utilisant uniquement un témoin positif exigeant une activation métabolique. Dans ce cas, cette seule réponse dans un témoin positif démontrera à la fois l'activité du système d'activation métabolique et la réactivité du système d'essai. Chaque témoin positif doit être utilisé à une ou plusieurs concentrations devant normalement donner lieu à une augmentation reproductible et détectable par rapport à la valeur de fond afin de démontrer la sensibilité du système d'essai, et la réponse ne doit pas être compromise par une cytotoxicité supérieure aux limites fixées dans la présente méthode d'essai (voir paragraphe 20).

Tableau 1. Substances de référence recommandées pour la vérification des compétences du laboratoire et pour la sélection des témoins positifs.

Condition d'activation métabolique	Locus	Substance chimique et N° CAS.
en l'absence d'une activation exogène	<i>Hprt</i>	Méthanesulfonate d'éthyle [n° CAS 62-50-0] Ethylnitrosourée [n° CAS 759-73-9] Oxyde de nitro-4 quinoléine [n° CAS 56-57-5]
	<i>XPRT</i>	Streptonigrine [n° CAS 3930-19-6] Mitomycine C [n° CAS 50-07-7]
en présence d'une activation exogène	<i>Hprt</i>	Méthyl-3 cholantrène [n° CAS 56-49-5] Diméthyl7,12 benzanthrène [n° CAS 57-97-6] Benzo[a]pyrène [n° CAS 50-32-8]
	<i>XPRT</i>	Benzo[a]pyrène [n° CAS 50-32-8]

MODE OPÉRATOIRE

Traitement avec le produit chimique testé

25. Les cellules en prolifération sont traitées avec le produit chimique d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique. La durée d'exposition doit être suffisante (de 3 à 6 heures sont généralement efficaces).
26. Le nombre minimal de cellules utilisées pour chaque culture d'essai (témoin et traitée) à chaque étape de l'essai doit être basé sur la fréquence de mutants spontanés. Il est conseillé en général de traiter et repiquer suffisamment de cellules pour préserver 10 mutants spontanés dans chaque culture à toutes les phases de l'essai (17). La fréquence des mutants spontanés varie en général entre 5 et 20 x 10⁻⁶. Avec une fréquence de mutants spontanés de 5 x 10⁻⁶ et pour entretenir un nombre suffisant de mutants spontanés (10 ou plus) même pour les cultures traitées à des concentrations causant une cytotoxicité de 90 % pendant le traitement (10 % de SR), il est nécessaire de traiter au moins 20 x 10⁶ cellules. Il faut en outre qu'un nombre suffisant de cellules (jamais moins de 2 millions) soient cultivées durant la période d'expression et étalées sur plaque pour la sélection des mutants (17).

Délai d'expression phénotypique et mesure de la fréquence des mutants

27. À l'issue de la période de traitement, les cellules sont cultivées de façon à permettre l'expression phénotypique de mutants. Un minimum de 7 à 9 jours suffit en général à l'expression phénotypique presque optimale des mutants Hprt et xprt nouvellement introduits (43) (44). Durant cette période, les cellules sont régulièrement mises en sous-culture pour préserver leur croissance exponentielle. Après l'expression phénotypique, les cellules sont à nouveau étalées sur plaque dans le milieu avec et sans agent sélectif (6-thioguanine) afin de déterminer le nombre de mutants et l'efficacité de clonage au moment de la sélection, respectivement. Cette opération peut se faire avec des boîtes pour cultures monocouche ou avec des plaques micropuits pour cellules en suspension. S'agissant de la sélection des mutants, il convient d'étaler sur des plaques les cellules suivant une densité qui assure la récupération optimale des mutants (en évitant notamment la coopération métabolique) (17). On incube les plaques pendant une durée appropriée à une croissance optimale des colonies (par exemple de 7 à 12 jours), puis on compte les colonies. On corrige le nombre de colonies de mutants par l'efficacité de clonage au moment de la sélection des mutants pour obtenir la fréquence des mutants (voir l'appendice 2 pour les formules).

Compétence du laboratoire

28. Afin d'acquérir une expérience suffisante de l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit avoir réalisé une série d'expériences avec des substances chimiques positives de référence agissant selon des mécanismes variés (au moins une avec activation métabolique et une sans activation métabolique, sélectionnées parmi les substances chimiques énumérées au tableau 1) et avec plusieurs témoins négatifs (en utilisant divers solvants/véhicules). Ces réponses de témoins positifs et négatifs doivent être cohérentes par rapport à la littérature. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 30 à 33.
29. Une sélection de substances chimiques utilisées comme témoins positifs (voir tableau 1) doit être testée en l'absence et en présence d'une activation métabolique, l'objectif étant de démontrer que le laboratoire possède la compétence nécessaire pour détecter des produits chimiques mutagènes, de déterminer l'efficacité du système d'activation métabolique et de prouver l'adéquation des conditions de croissance cellulaire durant le traitement, l'expression phénotypique et la sélection des mutants, ainsi que l'adéquation des procédures d'évaluation. Il conviendra de définir une plage de concentrations des substances chimiques sélectionnées qui permette d'obtenir des augmentations reproductibles et liées à la concentration par rapport aux valeurs de fond, afin de démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai.

Données des témoins historiques

30. Le laboratoire doit établir:

- - une plage et une distribution des témoins positifs historiques,
- - une plage et une distribution des témoins négatifs (non traités, avec solvant) historiques.

31. Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées (22). Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution (17) (45) (46).

32. La base des données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit à l'origine être constituée à partir d'au moins 10 expériences, sachant qu'il serait préférable qu'elle en compte au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques [cartes C ou cartes X-barre, par exemple (47)], afin de déterminer la variabilité de leurs données de témoins positifs et négatifs et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie (46). On trouve dans la littérature (45) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

33. Les données des témoins négatifs désignent les fréquences des mutants issus de cultures réalisées en un seul exemplaire, ou de préférence de cultures répliquées, comme décrit au paragraphe 23. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire (17) (45) (46). Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes et qu'il soit prouvé que le système d'essai est « sous contrôle » (voir ci-dessus) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou d'erreur humaine.

34. Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée en termes de cohérence avec les bases de données des témoins historiques existantes du laboratoire. Toute incohérence majeure doit conduire à l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Présentation des résultats

35. La présentation des résultats doit inclure toutes les données nécessaires au calcul de la cytotoxicité (exprimée en SR). Les données, tant pour les cultures traitées que témoins, doivent inclure le nombre de cellules à la fin du traitement, le nombre de cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement, et le nombre de colonies (ou de puits sans colonies pour la méthode utilisant des plaques micropuits). Il convient d'exprimer la SR pour chaque culture en pourcentage du témoin concomitant contenant le solvant (Voir les définitions à l'appendice 1).
36. La présentation des résultats doit également inclure toutes les données nécessaires au calcul de la fréquence des mutants. Les données, tant pour les cultures traitées que témoins, doivent inclure: (1) le nombre de cellules étalées sur plaque avec et sans agent sélectif (au moment où les cellules sont étalées sur plaque pour la sélection des mutants), et (2) le nombre de colonies (ou le nombre de puits sans colonies pour la méthode utilisant des micropuits) sur les plaques avec et sans agent sélectif. On corrige le nombre de colonies de mutants (sur les plaques avec agent sélectif) par l'efficacité de clonage (sur les plaques sans agent sélectif) pour obtenir la fréquence des mutants. Il convient d'exprimer la fréquence des mutants en nombre de cellules mutantes par million de cellules viables (Voir les définitions à l'appendice 1).
37. Les données seront présentées séparément pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Critères d'acceptabilité

38. L'acceptation de l'essai repose sur les critères suivants:
 - Les données relatives aux témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins négatifs historiques du laboratoire (voir paragraphe 33).
 - Les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 24) doivent induire des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants.
 - Deux conditions expérimentales (à savoir avec et sans activation métabolique) ont été testées, à moins que l'une d'entre elles ait abouti à des résultats positifs (voir paragraphe 25).
 - Un nombre adéquat de cellules et de concentrations sont analysables (voir paragraphes 26, 27 et 19).

- Les critères de sélection de la concentration maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 20, 21 et 22.

Évaluation et interprétation des résultats

39. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées:

- au moins une des concentrations d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,
- un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la concentration,
- des résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 33).

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des mutations génétiques dans les cellules de mammifères en culture dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (46) (48).

40. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées:

- aucune concentration d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;
- un test de tendance approprié montre qu'il n'y a pas d'augmentation liée à la concentration;
- l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 33).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des mutations génétiques dans les cellules de mammifères en culture dans ce système d'essai.

41. Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou négative.

42. Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, tel que décrit ci-dessus, ou en vue d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'expert et/ou des investigations plus poussées. Il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires (le cas échéant) ou de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales modifiées (espacement des

concentrations, autres conditions d'activation métabolique [concentration de S9 ou origine de S9], par exemple).

43. Dans de rares cas, même après de nouvelles investigations, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure que les résultats sont positifs ou négatifs. La réponse au produit chimique d'essai devra alors être considérée comme équivoque (et donc potentiellement aussi bien positive que négative).

Rapport d'essai

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

Produit chimique d'essai:

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation, si disponibles;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue;
- solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;
- mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant:

- apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques;
- 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 exemple l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence quantitative et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants.

Solvant:

- justification du choix du solvant;
- pourcentage de solvant présent dans le milieu de culture final.

Cellules:

Pour les cultures mères du laboratoire:

- type et source des lignées cellulaires;
- nombre de repiquages, le cas échéant, et historique au laboratoire;
- caractéristiques du caryotype et/ou nombre modal de chromosomes;
- méthodes d'entretien des cultures cellulaires;

- absence de mycoplasmes;
- temps de doublement des cellules.

Conditions de l'essai:

- justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris données concernant la cytotoxicité et les limites de solubilité, par exemple;
- composition du milieu, concentration de CO₂, degré d'humidité;
- concentration du produit chimique d'essai sous la forme de sa concentration finale dans le milieu de culture (par exemple en µg ou mg/ml ou mM du milieu de culture);
- concentration (et/ou volume) de solvant et de produit chimique d'essai ajoutés au milieu de culture;
- température d'incubation;
- temps d'incubation;
- durée du traitement;
- densité des cellules pendant le traitement;
- type et composition du système d'activation métabolique (source du S9, méthode de préparation du mélange S9, concentration ou volume de mélange S9 et de S9 dans le milieu de culture final, contrôles de la qualité du S9);
- substances témoins positives et négatives, concentrations finales pour chacune des conditions de traitement;
- durée de la période d'expression (avec le nombre de cellules déposées et de repiquages et les programmes de nutrition, le cas échéant);
- identité de l'agent sélectif et sa concentration;
- critères d'acceptabilité des essais;
- méthodes utilisées pour dénombrer les cellules viables et les cellules mutantes;
- méthodes utilisées pour mesurer la cytotoxicité;
- toute information supplémentaire concernant la cytotoxicité et la méthode utilisée;
- temps d'incubation après étalement sur une plaque;
- critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque;
- méthodes utilisées pour déterminer le pH, l'osmolalité et la précipitation.

Résultats:

- nombre de cellules exposées et nombre de cellules repiquées pour chaque culture;

- mesures de la cytotoxicité et autres observations le cas échéant;
- signes de précipitation et moment de la détermination;
- nombre de cellules étalées sur plaque dans un milieu sélectif et dans un milieu non sélectif;
- nombre de colonies dans un milieu non sélectif et nombre de colonies résistantes dans un milieu sélectif, et fréquences de mutants correspondantes;
- relation concentration-réponse, si possible;
- données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs (concentrations et solvants) concomitantes;
- données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs historiques, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts-types et intervalle de confiance (par exemple 95 %) et nombre de données;
- analyses statistiques (pour chaque culture et chaque lot de réplicats, le cas échéant), et valeurs P le cas échéant.

Discussion des résultats.

Conclusion.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations N° 2XX, OCDE, Paris.
- (2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. et Tindall K.R. (Eds.). (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, ColdSpringHarbor Laboratory, New York, New York.
- (3) Chu E.H.Y. et Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis, 61, 1306-1312.
- (4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. et Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Mutagen., 4, 394-403.
- (5) Aaron C.S. et Stankowski L.F. Jr. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.
- (6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. et Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.
- (7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. et Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. Mutation Res., 196, 17-36.
- (8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. et Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.
- (9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. et Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.
- (10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

- (11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. et Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 49, 439-452.
- (12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. et Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634, 177-183.
- (13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., et Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and rRelative Predictivity. *Mutation. Res.*, 584, 1–256.
- (14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. et Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135-141.
- (15) Liber H.L., Yandell D.W. et Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9-17.
- (16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. et Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133-147.
- (17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. et Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based Upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds), Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., et Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 86, 193-214.
- (19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, *Mutation Res.*, 85, 165-175.
- (20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff, R., et Hsie, A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2-Transformed Cells, *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411-1415.

- (21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., et Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci.*, 83(24): 9616–9620.
- (22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A. et Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscrit en préparation).
- (23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. et Stokes W. Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, 33, 261-287.
- (24) Rosen M.P., San R.H.C. et Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, *Can. Lett.* 8, 299-305.
- (25) Natarajan A.T., Tate A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. et de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, 83-90.
- (26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. et Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, 365-373.
- (27) Ames B.N., McCann J. et Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
- (28) Maron D.M. et Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173, 215.
- (29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. et Wolf R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.* 7, 175-177.
- (30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. et Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. et Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

- (31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. et Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.
- (32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. et Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.
- (33) PNUE. (2001). Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants, Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE). Disponible à l'adresse suivante: [<http://www.pops.int/.html>].
- (34) Tan E.-L. et Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina γ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT system. *Mutation Res.*, 84, 147-156.
- (35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Mammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 4, 7-18.
- (36) Li A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 4, 7-18.
- (37) Krahn D.F., Barsky F.C. et McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice R.R., Costa D.L., Schaich K.M. (Eds.). (Eds) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
- (38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. et Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5, 795-801.
- (39) OCDE (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Disponible sur demande auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques.
- (40) Brookmire L., Chen J.J. et Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environ. Mol. Mutation Res.*, 54, 36-43. *Mol. Mutation Res.*, 54, 36-43.

- (41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,
- (42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Available at: [<https://federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (43) O'Neill J.P., et Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-Thioguanine Resistance in Chinese Hamster Ovary Cells (CHO/HGPRT system), *Mutation Res.*, 59, 109-118.
- (44) Chiewchanwit T., Ma H., el Zein R., Hallberg L. et Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutation Res.*, 1335(2):121-8.
- (45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus HJ. et Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, 723, 87-90.
- (46) OCDE .(2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O. et Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (48) Fleiss J. L., Levin B. et Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Troisième Edition, New York: John Wiley & Sons.

Appendice 1

DÉFINITIONS

Concentrations: désigne les concentrations finales du produit chimique d'essai dans le milieu de culture.

Cytotoxicité: pour les essais visés par la présente méthode d'essai, la cytotoxicité correspond à une baisse de la survie relative des cellules traitées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe spécifique).

Délai d'expression phénotypique: délai après traitement au bout duquel l'altération génique est fixée dans le génome et tous les produits géniques préexistants sont déplétés au point que le caractère phénotypique est modifié.

Efficacité de clonage: pourcentage de cellules étalées sur plaque à une faible densité qui sont capables de se développer pour former une colonie dénombrable.

Fréquence des mutants (FM): nombre de colonies de mutants observées divisé par le nombre de cellules étalées sur plaque dans un milieu sélectif, corrigé de l'efficacité (ou viabilité) du clonage au moment de la sélection.

Génotoxique: terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, adduits, remaniements, mutations ou aberrations chromosomiques et aneuploidies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Mélange S9: mélange de fraction S9 de foie et de cofacteurs nécessaires à l'activité des enzymes métaboliques.

Milieu HAT: milieu composé d'hypoxanthine, d'aminoptérine et de thymidine, qui sert à nettoyer les mutants Hp^rt.

Milieu MPA: milieu composé de xanthine, d'adénine, de thymidine, d'aminoptérine et d'acide mycophénolique, qui sert à nettoyer les mutants Xp^rt.

Mutagène: qui produit une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Mutagènes décalant le cadre de lecture: produits chimiques entraînant l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de bases dans la molécule d'ADN.

Mutagènes provoquant la substitution de paires de bases: produits chimiques qui entraînent le remplacement d'une ou plusieurs paires de bases de l'ADN.

Mutation directe: mutation de gène de la forme parentale en une forme mutante, qui

engendre une modification ou une perte de l'activité enzymatique ou de la fonction de la protéine codée.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Prolifération cellulaire: augmentation du nombre de cellules résultant de la division cellulaire mitotique.

Recombinaison mitotique: durant la mitose, recombinaison entre chromatides homologues pouvant induire des cassures double brin de l'ADN ou une perte d'hétérozygotie.

Survie relative (SR): la SR sert à mesurer la cytotoxicité liée à un traitement. Elle correspond à l'efficacité de clonage (EC) des cellules étalées sur plaques immédiatement après le traitement, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement, par rapport à l'efficacité de clonage dans les témoins négatifs (à qui l'on attribue une survie de 100 %).

S9 liver fractions: supernatant of liver homogenate after 9000g centrifugation, i.e. raw liver extract

Témoin avec solvant: terme générique désignant les cultures témoins recevant uniquement le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai.

Témoins non traités: cultures ne recevant aucun traitement (ni produit chimique d'essai ni solvant) mais préparées parallèlement et de la même façon que les cultures exposées au produit chimique d'essai.

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

Appendice 2**FORMULES POUR L'ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ ET DE LA FRÉQUENCE DES MUTANTS**

La cytotoxicité est évaluée par la survie relative (SR), c'est-à-dire l'efficacité de clonage (EC) des cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement, par rapport à l'efficacité ajustée du clonage dans les témoins négatifs (à qui l'on attribue une survie de 100 %) (voir la formule de SR ci-après).

L'EC ajustée pour une culture traitée par un produit chimique d'essai est calculée comme suit:

$$\text{EC ajustée} = \frac{\text{Nombre de cellules à la fin du traitement}}{\text{Nombre de cellules au début du traitement}}$$

La SR pour une culture traitée par un produit chimique d'essai est calculée comme suit:

$$\text{SR} = \frac{\text{EC ajustée pour la culture traitée}}{\text{EC ajustée pour le témoin avec solvant}} \times 100$$

La fréquence des mutants correspond à l'efficacité de clonage de colonies de mutants dans un milieu sélectif divisée par l'efficacité de clonage dans un milieu non sélectif mesurée pour la même culture au moment de sélection.

$$\text{Fréquence des mutants} = \frac{\text{Efficacité de clonage des colonies de mutants dans un milieu sélectif}}{\text{Efficacité de clonage en milieu non sélectif}}$$

Lorsque des plaques sont utilisées pour renforcer l'efficacité de clonage:

$$\text{EC} = \text{Nombre de colonies} / \text{Nombre de cellules étalées sur plaque.}$$

Lorsque des plaques micropuits sont utilisées pour renforcer l'efficacité de clonage:

Le nombre de colonies par puits sur les plaques micropuits obéit à la loi de Poisson.

$$\text{EC} = -\text{LnP}(0) / \text{Nombre de cellules étalées sur plaque par puits}$$

Où $-\text{Ln P}(0)$ est le nombre probable de puits vides parmi les puitsensemencés et correspond à la formule suivante:

$$\text{LnP}(0) = -\text{Ln} (\text{nombre de puits vides} / \text{nombre de puitsensemencés})$$

(3) Dans la partie B, le chapitre B.22 est remplacé par le texte suivant :

«B.22 ESSAI DE MUTATION LÉTALE DOMINANTE CHEZ LE RONGEUR

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 478 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les méthodes d'essai sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La présente version modifiée de la méthode d'essai reflète plus de trente années d'expérience de cet essai et tient compte des possibilités de l'intégrer ou de le combiner à d'autres essais de toxicité, notamment pour le développement, la reproduction ou encore des essais de génotoxicité; cependant, étant donné les limitations de l'essai et le grand nombre d'animaux utilisés, cet essai n'a pas vocation à être utilisé en première intention, mais plutôt comme méthode d'essai supplémentaire quand il n'existe pas d'alternative pour satisfaire les exigences réglementaires. Combiner différents essais de toxicité permet potentiellement d'épargner un grand nombre d'animaux utilisés dans les tests. L'ODE a élaboré un document qui fournit des éléments d'information concis sur les essais de toxicologie génétique et donne un aperçu des récents changements qui ont été apportés aux lignes directrices de toxicité génétique de l'OCDE(1).
2. L'essai de mutation létale dominante a pour but de détecter si certains produits chimiques engendrent des mutations résultant d'aberrations chromosomiques dans les cellules germinales. En outre, l'essai de mutation létale dominante se prête bien à l'évaluation de la génotoxicité car, malgré des variations entre les espèces, les facteurs du métabolisme *in vivo*, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN sont actifs et contribuent aux réponses. L'apparition d'une mutation létale dominante à la suite d'une exposition à un produit chimique d'essai indique que cette substance a affecté le tissu germinale de l'animal étudié.
3. Les mutations létales dominantes provoquent la mort de l'embryon ou du fœtus. L'apparition d'une mutation létale dominante à la suite d'une exposition à un produit chimique indique que cette substance a affecté les cellules germinales de l'animal étudié.
4. Un essai de mutation létale dominante permet de confirmer les résultats positifs d'essais utilisant des indicateurs somatiques *in vivo*, et constitue un indicateur pertinent pour prédire le risque chez l'homme de pathologies génétiques transmises par le biais des cellules germinales. Cependant cet essai requiert l'utilisation d'un grand nombre d'animaux et mobilise beaucoup de temps de travail, le rendant onéreux et fastidieux à mener. Étant donné la fréquence importante de mutations dominantes létales spontanées, la

sensibilité de l'essai pour détecter de faibles augmentations dans la fréquence des mutations est généralement limitée.

5. Les définitions des termes clés figurent à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

6. La plupart du temps, l'essai est conduit sur des souris (2) (3) (4), mais d'autres espèces, telles que le rat (5) (6) (7) (8), peuvent être utilisées si cela est justifié sur le plan scientifique. Si, en général, les mutations létales dominantes résultent d'aberrations chromosomiques majeures (anomalies structurales et numériques) (9) (10) (11), l'éventualité de mutations génétiques ne peut être écartée. Une mutation létale dominante est une mutation qui se produit dans une cellule germinale, ou qui se fixe après la fécondation dans le jeune embryon, et qui n'entraîne pas de dysfonctionnement du gamète, mais qui est mortelle pour l'œuf fécondé ou pour l'embryon en cours de développement.
7. Des mâles identifiés sont accouplés successivement avec des femelles vierges, à des intervalles appropriés. Le nombre d'accouplements après le traitement dépend de l'objectif final de l'étude de mutation létale dominante (paragraphe 23) et doit garantir l'évaluation des mutations létales dominantes à toutes les phases de maturation des cellules germinales mâles (12).
8. Cet essai n'est pas pertinent s'il est prouvé que le produit chimique ou son/ses métabolite(s), n'atteindront pas le testicule.

PRINCIPE DE L'ESSAI

9. En général, des animaux mâles sont exposés à un produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine puis accouplés avec des femelles vierges non traitées. Différents types de cellules germinales peuvent être testées en utilisant différents intervalles d'accouplement. À la suite de l'accouplement, les femelles sont euthanasiées après une période de temps appropriée et leur utérus est examiné afin de déterminer le nombre d'embryons implantés, ainsi que celui des embryons vivants et morts. Pour déterminer la létalité dominante d'un produit chimique d'essai, le nombre d'embryons implantés vivants par femelle dans le groupe traité est comparé au nombre d'embryons implantés vivants par femelle dans le groupe témoin véhicule/solvant. L'augmentation du nombre d'embryons implantés morts par femelle dans le groupe traité par rapport au groupe témoin reflète la perte après implantation causée par le produit chimique d'essai. La perte après implantation est calculée en déterminant le rapport du nombre d'embryons implantés morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe traité et en le comparant au rapport du nombre d'embryons implantés morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe témoin. La perte avant implantation peut être évaluée en retranchant au nombre de corps jaunes le

nombre total d'embryons implantés, soit le nombre total d'implants par femelle dans le groupe traité et dans le groupe témoin.

VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

10. La compétence à mener cet essai est établie sur la base d'informations démontrant l'aptitude à reproduire des fréquences de mutations létales dominantes à partir de données publiées (par exemple (13) (14) (15) (16) (17) (18)) avec les substances chimiques utilisées comme témoins positifs (réponses faibles comprises) telles que celles énumérées dans le tableau 1, et les témoins contenant le véhicule, et à obtenir des fréquences de témoin négatif cohérentes avec la plage de données acceptable relatives aux témoins (voir références ci-dessus) ou avec la distribution des données des témoins historiques du laboratoire, le cas échéant.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Choix des espèces animales

11. Il convient d'employer des animaux sains et sexuellement matures issus de souches de laboratoire courantes. Les souris sont habituellement utilisées, mais les rats peuvent également convenir. Toute autre espèce appropriée de mammifère peut être employée à condition qu'une justification scientifique de ce choix soit donnée dans le rapport.

Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux

12. Pour les rongeurs, la température de l'animalerie doit être maintenue à 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 40 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. On dispense un éclairage artificiel faisant alterner des séquences de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à volonté. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Avant le traitement ou l'accouplement, les rongeurs doivent être mis en cage par petits groupes (de cinq maximum) du même sexe si aucun comportement agressif n'est à craindre ou n'est observé, de préférence dans des cages solides dotées d'un enrichissement environnemental approprié. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié sur le plan scientifique.

Préparation des animaux

13. Des animaux adultes mâles et femelles, sains et sexuellement matures, sont répartis au hasard entre le groupe témoin et les groupes traités. Chaque animal est identifié individuellement selon une méthode sans cruauté, la moins invasive possible (par exemple,

baguage, étiquetage, pose d'une puce électronique ou identification biométrique, en évitant l'entaille des oreilles ou la phalangectomie) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Les cages doivent être placées de manière à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Il convient d'éviter toute contamination croisée entre le témoin positif et le produit chimique d'essai. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser ± 20 % du poids moyen de chaque sexe.

Préparation des doses

14. Lorsque les produits chimiques d'essai sont solides, ils sont dissous ou mis en suspension dans des solvants ou des véhicules appropriés, ou incorporés aux aliments ou à l'eau de boisson avant d'être administrés aux animaux. Les produits chimiques liquides peuvent être administrés directement ou dilués avant d'être administrés. En cas d'exposition par inhalation, les produits chimiques d'essai peuvent être administrés sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

Conditions de l'essai

Solvant/véhicule

15. Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées, ni pouvoir réagir avec le produit chimique d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible. Parmi les exemples de solvants/véhicules compatibles couramment utilisés figurent notamment l'eau, le sérum physiologique, les solutions de méthylcellulose, les solutions de carboxyméthylcellulose sodique, l'huile d'olive et l'huile de maïs.

Témoins positifs

16. Des animaux témoins positifs sont toujours inclus simultanément dans l'essai, à moins que le laboratoire n'ait déjà démontré ses compétences dans la conduite de l'essai et n'ait mené le test en routine récemment (par exemple dans les cinq dernières années). Toutefois, il n'est pas nécessaire de leur administrer le produit témoin positif par la même voie que celle du produit chimique d'essai, ni de réaliser des prélèvements à chaque intervalle d'accouplement. Les substances utilisées comme témoins positifs doivent induire des mutations létales dominantes de façon fiable et dans les mêmes conditions que l'essai. À l'exception du traitement administré, les animaux des groupes témoins sont traités de la même manière que ceux des groupes de traitement.

17. Les doses des substances chimiques utilisées comme témoins positifs sont sélectionnées de manière à produire des effets faibles ou modérés qui permettent d'évaluer de manière critique les performances et la sensibilité de l'essai, mais qui induisent systématiquement des effets létaux dominants. Des exemples de substances chimiques utilisés comme témoins positifs, et des doses idoines, figurent au tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1: Exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs.

Substance chimique [n°CAS 51-18-3] (15)	Plage de dose effective (rongeurs) (mg/kg)	Période d'administration (en nombre de jours)
Triéthylènemélatamine [n° CAS 51-18-3] (15)	0,25 (souris)	1
Cyclophosphamide [n° CAS 50-18-0] (19)	50-150 (souris)	5
Cyclophosphamide [n° CAS 50-18-0] (5)	25-100 (rats)	1
Méthanesulfonate d'éthyle [n° CAS 62-50-0] (13)	100-300 (souris)	5
Acrylamide monomère [n° CAS 79-06-1] (17)	50 (souris)	5
Chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (souris)	1

Témoins négatifs

18. Les animaux témoins négatifs, traités seulement avec le solvant ou avec le véhicule, et traités par ailleurs de manière identique aux groupes témoins, sont inclus à chaque moment de prélèvement (20). En l'absence de données significatives observées ou publiées montrant que le solvant/véhicule choisi n'induit pas de mutation létale dominante ou d'autres effets délétères, des animaux témoins non traités sont également inclus à chaque moment de prélèvement afin d'établir l'acceptabilité du témoin contenant le véhicule.

MODE OPERATOIRE

Nombre d'animaux

19. Des mâles identifiés sont accouplés successivement à des intervalles appropriés prédéterminés (par exemple une fois par semaine, paragraphes 21 et 23) de préférence à une femelle vierge. Un nombre suffisamment important de mâles est prévu (et un nombre correspondant de femelles accouplées à chaque intervalle d'accouplement) afin d'obtenir

l'efficacité statistique nécessaire pour détecter une fréquence de mutation létale dominante au moins multipliée par deux (paragraphe 44).

20. Le nombre de femelles par intervalle d'accouplement doit également être défini à l'avance par calculs statistiques, afin de pouvoir détecter au minimum un doublement de la fréquence de mutation létale dominante (c'est-à-dire suffisamment de femelles gravides pour obtenir au moins 400 embryons implantés au total) (20) (21) (22) (23) et escompter au moins un embryon implanté mort par unité d'analyse (soit par groupe d'accouplement et par dose) (24).

Période d'administration et intervalles d'accouplement

21. Le nombre d'accouplements faisant suite au traitement est régi par le déroulement du traitement et doit assurer l'évaluation d'inductions de mutations létales dominantes à toutes les phases de maturation des cellules germinales mâles (12) (25). Pour un traitement unique impliquant jusqu'à cinq doses administrées quotidiennement, il faut compter 8 (pour les souris) ou 10 (pour les rats) accouplements à une semaine d'intervalle après le dernier traitement. En cas d'administrations multiples, le nombre d'accouplements peut être réduit proportionnellement à l'allongement de la période d'administration, tout en conservant pour objectif d'évaluer toutes les phases de la spermatogenèse (par exemple, après une exposition de 28 jours, seuls 4 accouplements par semaine suffisent à évaluer toutes les phases de la spermatogenèse chez la souris). Tous les calendriers de traitement et d'accouplement doivent être scientifiquement justifiés.
22. Les femelles doivent être laissées avec les mâles au moins pendant la durée d'un cycle œstral (par exemple, une semaine couvre un cycle œstral chez la souris et le rat). Les femelles qui ne se sont pas accouplées au cours d'une semaine donnée peuvent être utilisées pour un autre intervalle d'accouplement, ou jusqu'à ce que l'accouplement ait eu lieu, ce qu'indique la présence de sperme dans le vagin ou d'un bouchon vaginal.
23. Le régime d'exposition et d'accouplement retenu dépend de l'objectif final de l'étude de mutation létale dominante. Si elle a pour but de déterminer si un produit chimique donné induit des mutations létales dominantes *per se*, la méthode retenue consistera alors en l'exposition d'un cycle entier de spermatogenèse (soit 7 semaines chez la souris, à raison de 5 à 7 traitements par semaine) et en un accouplement à la fin du cycle. Cependant, si l'objectif est de recenser le type de cellule germinale sensible à une induction de mutation létale dominante, on préférera une exposition unique ou de 5 jours, suivie d'un accouplement hebdomadaire.

Niveaux de dose

24. Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables pour orienter le choix des doses, cette étude préliminaire doit être effectuée dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une

souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale (26). Elle devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose la plus élevée qui sera tolérée sans faire apparaître de toxicité limitante, dans le cadre de la durée de l'étude (par exemple, comportement ou réactions anormaux, baisse mineure du poids corporel ou cytotoxicité du système hématopoïétique), mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant d'euthanasier les animaux (27).

25. En outre, la DMT ne doit pas affecter l'accouplement (21).
26. Les produits chimiques d'essai ayant une activité biologique spécifique à des niveaux de doses faibles et non toxiques (telles que les hormones et les mitogènes) et ceux dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées peuvent être considérés comme des exceptions aux critères de détermination des doses et sont évalués au cas par cas.
27. Pour permettre d'obtenir des informations sur la relation dose-réponse, une étude complète doit comporter un groupe témoin négatif et au moins trois niveaux de doses, espacés en général d'un facteur de 2, mais pas de plus de 4. Si le produit chimique d'essai ne provoque aucune toxicité dans le cadre d'une étude de détermination des doses, ou d'après les données disponibles, la dose la plus élevée pour une administration unique doit être de 2 000 mg/kg de poids corporel. Néanmoins, si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, la dose administrée la plus élevée devra correspondre à la DMT et les niveaux de dose employés devront de préférence s'étendre de la dose maximale à une dose induisant peu ou pas de toxicité. Pour les produits chimiques toxiques, la dose limite pour une période d'administration de 14 jours ou plus est de 1 000 mg/kg de poids corporel, et pour des périodes d'administration de moins de 14 jours, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour.

Administration des doses

28. Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse, orale (par gavage) ou l'implantation sont autant de choix qui peuvent être considérés comme justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du/des tissu(s) cible(s). L'injection intrapéritonéale n'est en général pas recommandée, car elle ne constitue pas une voie d'exposition humaine envisagée, et ne sera utilisée qu'en cas de justification scientifique spécifique. Si le produit chimique d'essai est mélangé à l'alimentation ou à l'eau de boisson, surtout dans le cas d'un dosage unique, il convient de s'assurer que le délai entre l'absorption de nourriture et d'eau et l'accouplement est suffisant pour permettre une détection des effets (paragraphe 31). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit normalement pas excéder 1 ml/100 g de poids corporel, sauf

pour les solutions aqueuses, où un maximum de 2 ml/100 g est acceptable. L'utilisation de volumes plus importants (si la législation relative au bien-être animal le permet) doit être justifiée. Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant par rapport au poids corporel à tous les niveaux de doses.

Observations

29. Les animaux d'essai font l'objet d'un examen clinique général. Les signes cliniques doivent être consignés au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration. Au moins deux fois par jour pendant la durée du traitement, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Chaque animal doit être pesé au début de l'étude et au moins une fois par semaine pendant les études à doses répétées, ainsi qu'au moment de l'euthanasie. La consommation alimentaire est mesurée au moins une fois par semaine. Si le produit chimique d'essai est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai (27).

Collecte et traitement des tissus

30. Les femelles sont euthanasiées au cours de la seconde moitié de la gestation, au 13^e jour de gestation pour les souris et au 14-15^e jour de gestation pour les rats. Le contenu de l'utérus est examiné afin de déterminer les effets létaux dominants et de recenser le nombre d'embryons implantés, le nombre d'embryons vivants et morts ainsi que le nombre de corps jaunes.
31. Les cornes utérines et les ovaires sont exposés pour permettre de compter le nombre de corps jaunes, et les fœtus sont ôtés, comptés et pesés. Il convient d'examiner soigneusement l'utérus en vue de déceler et de comptabiliser toutes les résorptions, y compris celles dissimulées par les fœtus vivants. La mortalité fœtale est consignée. Le nombre de femelles fécondées ainsi que le nombre total d'embryons implantés, de pertes avant implantation et de mortalité après implantation (y compris les résorptions précoces et tardives) sont également consignés. De plus, les fœtus visibles peuvent être conservés dans une solution de Bouin pendant au moins 2 semaines, pour un examen ultérieur des principales malformations externes (28) permettant de fournir des informations supplémentaires sur les effets du produit testé sur la reproduction et le développement.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

32. Les résultats doivent être présentés sous forme d'un tableau qui indique le nombre de mâles accouplés, le nombre de femelles gravides et le nombre de femelles non gravides. Les résultats de chaque accouplement, comprenant l'identité de chaque mâle et de chaque femelle, doivent être mentionnés individuellement. Pour chaque femelle, il convient d'indiquer l'intervalle d'accouplement, le niveau de la dose reçue par les mâles traités et le nombre d'embryons implantés vivants et morts.
33. La perte après implantation est calculée en déterminant le rapport du nombre d'embryons implantés morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe traité et en le comparant au rapport du nombre d'embryons implantés morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe témoin traité avec le véhicule/solvant.
34. La perte avant implantation est calculée comme étant la différence entre le nombre de corps jaunes et le nombre d'embryons implantés ou la réduction du nombre moyen d'embryons implantés par femelle par comparaison avec les accouplements témoins. Quand la perte avant implantation a été évaluée, elle doit être mentionnée.
35. Le facteur létal dominant est estimé comme suit: $(\text{embryons morts avant implantation} / \text{total des embryons implantés par femelle}) \times 100$.
36. Les données de toxicité et les signes cliniques tels que décrits dans le paragraphe 29 sont consignés dans le rapport.

Critères d'acceptabilité

37. Les critères suivants déterminent l'acceptabilité de l'essai:
 - le témoin négatif utilisé simultanément est cohérent avec les normes publiées pour les données relatives aux témoins négatifs historiques ainsi qu'avec les données des témoins historiques du laboratoire, le cas échéant (paragraphe 10 et 18);
 - les témoins positifs utilisés simultanément induisent des réponses cohérentes avec les normes publiées pour les données relatives aux témoins positifs historiques ou avec la base de données des témoins positifs historiques du laboratoire, le cas échéant, et produisent une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (voir paragraphes 17 et 18);
 - le nombre idoine d'embryons implantés et de doses est analysé (paragraphe 20);
 - les critères de sélection de la dose maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 24 et 27.

Évaluation et interprétation des résultats

38. Au moins trois groupes de traitement sont analysés pour obtenir des données suffisantes pour l'analyse de la relation dose-réponse.

39. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si:

- au moins une des doses d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;
- un test approprié montre que l'augmentation est liée à la dose dans au moins une condition expérimentale (par exemple un intervalle d'accouplement d'une semaine); et
- des résultats se situent à l'extérieur de la plage acceptable relative aux témoins négatifs, ou des données relatives aux témoins négatifs historiques du laboratoire (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson), le cas échéant.

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des mutations létales dominantes dans les cellules germinales des animaux testés. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées figurent au paragraphe 44; d'autres approches statistiques recommandées sont également disponibles dans la littérature (20) (21) (24) (29). Les méthodes statistiques employées considèrent l'animal comme unité expérimentale.

40. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si:

- aucune dose d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;
- aucune condition expérimentale n'a révélé une augmentation liée à la dose; et
- l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la plage acceptable des données relatives aux témoins négatifs, ou des données relatives aux témoins négatifs historiques du laboratoire (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson), le cas échéant.

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme capable d'induire des mutations létales dominantes dans les cellules germinales des animaux testés.

41. Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou clairement négative.

42. Si la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, et afin d'établir la signification biologique d'un résultat (par exemple, une augmentation faible ou marginale), les données doivent être soumises à un jugement d'experts et/ou faire l'objet de recherches supplémentaires à l'aide des données expérimentales existantes, notamment les éléments indiquant si le résultat positif se trouve à l'extérieur de la plage acceptable concernant les

témoins négatifs¹, ou de la distribution des données du laboratoire concernant les témoins négatifs historiques (30).

43. Dans de rares cas, même après de nouvelles investigations, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure que les résultats sont positifs ou négatifs; les résultats seront alors déclarés équivoques.
44. Les méthodes statistiques employées considèrent l'animal mâle comme unité expérimentale. S'il est possible que le décompte (par exemple le nombre d'embryons implantés par femelle) suive la loi de Poisson et/ou que certaines proportions (par exemple une proportion d'embryons implantés morts) présentent une distribution binomiale, on observe souvent une surdispersion de ces données (31). Par conséquent, les analyses statistiques doivent d'abord recourir à un test de surdispersion ou de sousdispersion basé sur des tests de la variance tels que le test de variance binomiale de Cochran (32) ou le test de la C (α) de Tarone pour la surdispersion binomiale (31) (33). Si aucun écart par rapport à la dispersion binomiale n'est observé, un test de tendance de Cochran-Armitage peut être effectué pour les tendances de proportions dans les différents niveaux de doses (34) et des comparaisons par paires avec le groupe témoin peuvent être faites à l'aide d'un test exact de Fisher (35). De même, si aucun écart par rapport à la dispersion de Poisson n'est détecté, les tendances des décomptes peuvent être testées à l'aide de la régression de Poisson (36) et des comparaisons par paires avec le groupe témoin peuvent être réalisées dans le contexte du modèle de Poisson, à l'aide de contrastes par paires (36). Si une surdispersion ou une sousdispersion significative est détectée, il est recommandé de recourir à des méthodes non paramétriques (23, 31), notamment les tests par les rangs tels que le test de tendance de Jonckheere-Terpstra (37) et les tests de Mann-Whitney (38) pour les comparaisons par paires avec le groupe témoin traité avec le véhicule/solvant, mais aussi les tests de permutation, de rééchantillonnage ou de bootstrap pour les comparaisons de tendances et les comparaisons par paires avec le groupe témoin (31) (39).
45. Un essai positif de mutation létale dominante met en lumière la génotoxicité du produit chimique d'essai sur les cellules germinales du mâle traité de l'espèce testée.
46. Le fait d'examiner si les valeurs observées se situent à l'intérieur de la plage des témoins historiques peut fournir des indications au moment de l'évaluation de la signification biologique de la réponse (40).

Rapport d'essai

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

Résumé.

Produit chimique d'essai:

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation si disponibles;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue;
- solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;
- mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant:

- apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;
- 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:

- caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Préparation du produit chimique d'essai:

- justification du choix du véhicule;
- solubilité et stabilité du produit chimique dans le solvant/véhicule, si elles sont connues;
- préparation des formulations à administrer dans l'alimentation, l'eau de boisson ou par inhalation;
- déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple), lorsqu'elles ont été réalisées.

Animaux d'essai:

- espèces/souches utilisées et justification du choix;
- nombre, âge et sexe des animaux;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.;
- méthode d'identification individuelle des animaux;
- pour les études de courte durée: poids corporel de chaque mâle au début et à la fin de l'essai; pour les études d'une durée supérieure à une semaine: poids individuel des animaux et consommation de nourriture. La plage des poids corporels, ainsi que la moyenne et l'écart type pour chaque groupe doivent également être mentionnés.

Conditions de l'essai:

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule);

- données de l'étude préliminaire de détermination des concentrations;
- justification du choix des doses;
- détails sur la préparation du produit chimique d'essai;
- détails sur l'administration du produit chimique d'essai;
- justification du choix de la voie d'administration;
- méthodes de mesure de la toxicité animale, y compris, si elles existent, analyses histopathologiques ou hématologiques et fréquence des observations animales et des mesures du poids corporel;
- méthodes permettant de vérifier que le produit chimique d'essai a atteint le tissu cible ou la circulation sanguine en cas de résultats négatifs;
- dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration (ppm) du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson, et de la consommation, s'il y a lieu;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau;
- détails de l'enrichissement environnemental des cages;
- description détaillée des programmes de traitement et d'échantillonnage, et justification des choix;
- méthode d'analgésie;
- méthode d'euthanasie;
- procédures d'isolement et de conservation des tissus;
- source et numéros de lot de l'ensemble du matériel et de tous les réactifs (s'il y a lieu);
- méthodes d'énumération des mutations létales dominantes;
- programme d'accouplement;
- méthodes utilisées pour déterminer si l'accouplement a eu lieu;
- moment de l'euthanasie;
- critères permettant d'examiner les effets létaux dominants, y compris les corps jaunes, les embryons implantés, les résorptions et les pertes avant implantation, les embryons implantés vivants, les embryons implantés morts.

Résultats:

- état de santé des animaux avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité;
- poids corporel des mâles pendant le traitement et les périodes d'accouplement;
- nombre de femelles accouplées;

- relation dose-réponse, si possible;
- données relatives aux animaux témoins négatifs concomitants et données des témoins négatifs historiques avec plages, moyennes et écarts-types;
- données des témoins positifs concomitants;
- tableau de données pour chaque femelle gravide comprenant: le nombre de corps jaunes; le nombre d'embryons implantés; le nombre de résorptions et de pertes avant implantation; le nombre d'embryons implantés vivants; le nombre d'embryons implantés morts; le poids des fœtus;
- résumé des données ci-dessus pour chaque période d'accouplement et pour chaque dose, avec la fréquence des effets létaux dominants;
- analyses et méthodes statistiques employées.

Discussion des résultats.

Conclusion.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, N°234, OCDE, Paris.
- (2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.*(Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam
- (3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J. , Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group "Dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. Toxicol., 39, 173-185
- (4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res., 352:159-167.
- (5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.
- (6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.
- (7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. Toxicol. Lett. 20:325-329.
- (8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. Toxicol., 3:80-85.
- (9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.
- (10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

- (11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. *Birth Defects Res., C* 75:112-129.
- (12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutation Res.*, 352:169-172.
- (13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, *Mutation Res.*, 53: 21–27.
- (14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. *Mutation Res.*, 345:167-180.
- (15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 40:371-378.
- (16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, *Mutation Res.*, 99:303-314.
- (17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. *Mutation Res.*, 173:35-40.
- (18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, *Mutation Res.*, 296: 143-156.
- (19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In *Supplementary Mutagenicity Tests*. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.
- (20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417:19–30.
- (21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. *Mutation Res.*, 312:313-318.
- (22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods, Toxicol.*, 3A:124-141.

- (23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976). The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation. Res.*, 41: 277-288.
- (24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 1:353 – 360.
- (25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation. Res.*, 85:417-429.
- (26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.*, 7:313-319.
- (27) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 19.), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.
- (29) Kirkland D.J., (Ed.)(1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.
- (30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). “Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data”, *Mutation. Res.*, 723:87-90.
- (31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutation. Res.*, 272:35-58.
- (32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. *Biometrics*, 10: 417-451.
- (33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.
- (34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

- (35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).
- (36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston
- (37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika*, 41:133-145.
- (38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York
- (39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.
- (40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, New York.

Appendice 1

DÉFINITIONS

Produit chimique: une substance ou un mélange

Corps jaune: formation à l'intérieur de l'ovaire qui résulte de la transformation d'un follicule ayant expulsé l'ovocyte et qui a un rôle hormonal. Le nombre de corps jaunes dans les ovaires correspond au nombre d'ovocytes produits.

Mutation létale dominante: mutation qui se produit dans une cellule germinale ou qui se fixe après la fécondation, et qui est mortelle pour l'embryon ou le fœtus.

Taux de fertilité: nombre de femelles gravides divisé par le nombre total de femelles accouplées.

Intervalle d'accouplement: laps de temps entre la fin de l'exposition et l'accouplement des mâles traités. Le contrôle de cet intervalle permet d'évaluer les effets des produits chimiques sur différents types de cellules germinales. L'accouplement des souris au cours des semaines 1, 2, 3, 4, 5, 6, et 7 qui suivent la fin de l'exposition mesure les effets sur le sperme testiculaire, les spermatides condensées, les spermatides rondes, les spermatocytes au stade pachytène, les spermatocytes précoces, les spermatogonies différenciées, les spermatogonies en cours de différenciation et les spermatogonies des cellules souches.

Pertes avant implantation: différence entre le nombre d'embryons implantés et le nombre de corps jaunes. Elles peuvent aussi être estimées en comparant le nombre total d'embryons implantés par femelle dans les groupes traités et dans les groupes témoins.

Pertes après implantation: rapport du nombre d'embryons morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe traité comparé au rapport du nombre d'embryons morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe témoin.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

UVCB: substances chimiques de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes et matières biologiques

Appendice 2

CYCLE DE LA SPERMATOGENÈSE CHEZ LES MAMMIFÈRES

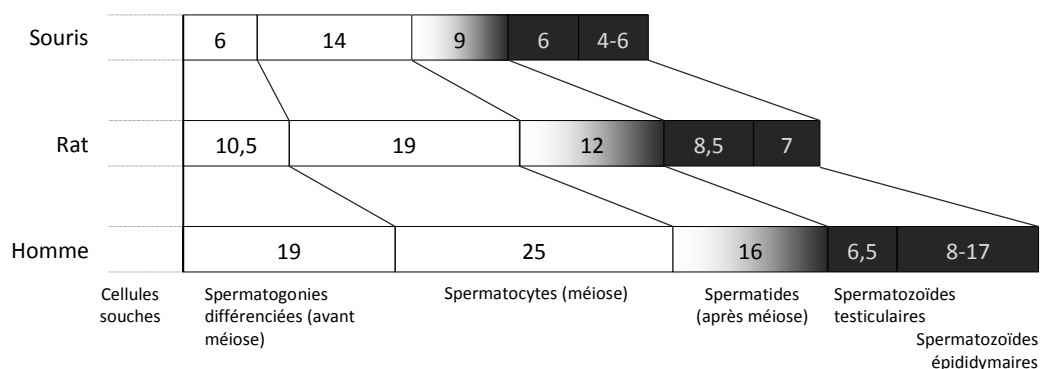


Fig.1: Comparaison de la durée (en jours) du développement des cellules germinales mâles chez la souris, le rat et l'homme. La réparation de l'ADN ne se produit pas pendant les périodes indiquées en grisé.

Cycle de la spermatogenèse chez la souris, le rat et l'homme (Adler, 1996). Les spermatogonies indifférenciées incluent les spermatogonies A-single, A-paired, et A-aligned (Hess et de Franca, 2008). Les A-single sont considérées comme les véritables cellules souches. C'est pourquoi, pour évaluer les effets sur les cellules souches, au moins 49 jours (chez la souris) doivent s'écouler entre la dernière injection du produit chimique d'essai et l'accouplement.

Références

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. *Mutat Res*, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science & Business Media:1-15.»

(4) Dans la partie B, le chapitre B.23 est remplacé par le texte suivant:

«B.23 ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR SPERMATOGONIES DE MAMMIFÈRES

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 483 (2016) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Les méthodes d'essai sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux.. La présente version modifiée de la méthode d'essai reflète les connaissances scientifiques acquises après de nombreuses années d'expérience de cet essai et tient compte des possibilités de l'intégrer ou de le combiner à d'autres études de toxicité ou de génotoxicité. Combiner différentes études de toxicité permet potentiellement de réduire le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ces essais. La présente méthode d'essai s'inscrit dans une série de lignes directrices sur la toxicologie génétique. L'OCDE a élaboré un document qui fournit des éléments d'information concis sur les essais de toxicologie génétique et donne un aperçu des récents changements qui ont été apportés aux lignes directrices de toxicologie génétique de l'OCDE (1).
2. L'essai d'aberration chromosomique pratiqué *in vivo* sur des spermatogonies de mammifères est destiné à détecter les produits chimiques qui causent des aberrations chromosomiques structurales dans les cellules de spermatogonies de mammifère (2) (3) (4). Par ailleurs, cet essai se prête bien à l'évaluation de la génotoxicité, car, malgré des variations entre les espèces, les facteurs du métabolisme *in vivo*, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN sont actifs et contribuent aux réponses. Cette méthode d'essai n'est pas conçue pour mesurer les aberrations numériques, et n'est pas utilisée de façon régulière dans ce but.
3. Cet essai mesure les aberrations chromosomiques structurales (de type chromosomique et chromatidique) qui surviennent dans les spermatogonies et devrait par conséquent permettre de prévoir l'induction de mutations héritées dans les cellules germinales.
4. Les définitions des termes clés figurent dans l'appendice.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

5. Les rongeurs sont couramment utilisés dans cet essai, mais dans certains cas, d'autres espèces peuvent convenir si cela est justifié sur le plan scientifique. Les préparations cytogénétiques standard des essais réalisés sur rongeurs permettent l'obtention de métaphases mitotiques (spermatogonies) et méiotiques (spermatocytes). Ces métaphases sont identifiées en fonction de la morphologie des chromosomes (4). Cet essai cytogénétique *in vivo* détecte les aberrations chromosomiques structurales dans les mitoses des spermatogonies. Les autres cellules cibles ne sont pas concernées par la présente méthode d'essai.

6. Afin de détecter les aberrations chromatidiques dans les cellules de spermatogonies, il faut examiner la première division cellulaire mitotique après le traitement, avant que ces aberrations n'évoluent en aberrations chromosomiques dans les divisions cellulaires ultérieures. Des informations complémentaires peuvent être obtenues après traitement des spermatocytes, à partir de l'analyse des chromosomes méiotiques mettant en évidence les aberrations chromosomiques structurales aux stades de la diacinèse et des métaphases I et II.
7. Les testicules contiennent plusieurs générations de spermatogonies (5). Ces différentes cellules germinales peuvent présenter des sensibilités diverses au traitement chimique. De ce fait, les aberrations détectées sont une réponse globale des populations de cellules de spermatogonies traitées. La majorité des cellules mitotiques présentes dans les préparations de testicules sont des spermatogonies de type B, dont le cycle cellulaire dure environ 26 heures (3).
8. Cet essai n'est pas pertinent s'il est prouvé que le produit chimique d'essai, ou son (ses) métabolite(s), n'atteindront pas le testicule.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

9. En règle générale, les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine et sont euthanasiés à des délais appropriés après le traitement. Avant l'euthanasie, les animaux sont traités avec un inhibiteur du fuseau (par exemple la colchicine ou le Colcemid®). Ensuite, les préparations chromosomiques effectuées à partir des cellules germinales sont colorées et les cellules en métaphase sont analysées pour mettre en évidence les aberrations chromosomiques.

VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

10. La compétence à mener cet essai est établie sur la base d'informations démontrant l'aptitude à reproduire les résultats escomptés concernant la fréquence des aberrations chromosomiques structurales dans les spermatogonies avec des substances chimiques utilisées comme témoins positifs (réponses faibles comprises) telles que celles énumérées dans le tableau 1 et à obtenir une fréquence avec témoins négatifs qui soit cohérente avec la plage acceptable des données publiées dans la littérature [par exemple (2)(3)(6)(7)(8)(9)(10)] ou avec la distribution des données des témoins historiques du laboratoire, le cas échéant.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Choix des espèces animales

11. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains issus de souches courantes de laboratoire. On utilise communément des souris mâles, mais des mâles d'autres espèces de mammifères appropriées peuvent cependant être employés si cela est justifié sur le plan

scientifique, et si cela permet de combiner cette étude à une méthode d'essai. L'utilisation d'une espèce autre que les rongeurs doit être scientifiquement justifiée dans le rapport.

Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux

12. Pour les rongeurs, la température de l'animalerie doit être maintenue à 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 40 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à volonté. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les rongeurs sont mis en cage par petits groupes d'individus (cinq au maximum par cage), si aucun comportement agressif n'est à craindre, de préférence dans des cages à fond plein dotées d'un enrichissement environnemental approprié. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié sur le plan scientifique.

Préparation des animaux

13. De jeunes adultes mâles en bonne santé (âgés de 8-12 semaines au début du traitement) sont normalement utilisés et sont répartis au hasard dans les groupes témoins et les groupes de traitement. Chaque animal est identifié individuellement selon une méthode sans cruauté, la moins invasive possible (par exemple, baguage, étiquetage, pose d'une puce électronique ou identification biométrique, en évitant l'entailage des oreilles ou la phalangectomie) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Les cages doivent être placées de manière à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Il convient d'éviter toute contamination croisée entre le témoin positif et le produit chimique d'essai. Au début de l'étude, la variation pondérale entre chaque animal doit être minimale et ne pas dépasser ± 20 %.

Préparation des doses

14. Les produits chimiques solides sont dissouts, mis en suspension dans des solvants ou véhicules appropriés ou incorporés dans les aliments ou dans l'eau de boisson avant d'être administrés aux animaux. Les produits chimiques liquides peuvent être administrés directement ou dilués avant d'être administrés. En cas d'exposition par inhalation, les produits chimiques d'essai peuvent être administrés sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

Conditions expérimentales - Solvant/véhicule

15. Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées, ni pouvoir réagir avec les produits chimiques d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité. Il est recommandé

d'envisager en premier lieu l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible. Parmi les exemples de solvants/véhicules compatibles couramment utilisés figurent notamment l'eau, le sérum physiologique, les solutions de méthylcellulose, les solutions de carboxyméthylcellulose sodique, l'huile d'olive et l'huile de maïs. En l'absence de données observées ou publiées montrant que le véhicule/solvant inhabituel sélectionné n'induit aucune aberration chromosomique structurale ou effet délétère, une étude initiale devra être réalisée afin d'établir l'acceptabilité du témoin de solvant/véhicule.

Témoins positifs

16. Des animaux témoins positifs sont toujours inclus simultanément dans l'essai, à moins que le laboratoire n'ait déjà démontré ses compétences dans la conduite de l'essai et n'ait mené le test en routine récemment (par exemple dans les cinq dernières années). Quand un témoin positif n'est pas testé en parallèle, des témoins d'analyse (lames fixées non colorées) doivent être compris dans chaque expérience. Ceux-ci peuvent être obtenus en incluant dans chaque étude des échantillons de référence en provenance de témoins positifs d'autres études conduites de façon périodique (par exemple tous les 6-18 mois) dans le laboratoire où le test est effectué, par exemple lors d'épreuves de compétence, et de façon plus régulière par la suite.
17. Les substances utilisées comme témoins positifs doivent produire, de façon fiable, un accroissement détectable de la fréquence des cellules présentant des aberrations chromosomiques par rapport au niveau spontané. Les doses des témoins positifs doivent être choisies de telle sorte que les effets soient nets mais que l'identité des lames codées ne soit pas évidente pour l'examineur. Des exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs figurent au tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1: Exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs.

Substances chimiques et n° CAS (n° de référence)
Cyclophosphamide [n° CAS 50-18-0] cyclophosphamide monohydratée [n° CAS 6055-19-2] (9)
Cyclohexylamine [n° CAS 108-91-8] (7)
Mitomycine C [n° CAS 50-07-7] (6)
Acrylamide monomère [n° CAS 79-06-1] (10)
Triéthylènemélatamine [n° CAS 51-18-3] (8)

Témoins négatifs

18. Les animaux servant de témoins négatifs, traités seulement avec le solvant ou avec le véhicule, et traités par ailleurs de manière identique aux groupes de traitement, sont inclus à chaque moment de prélèvement. En l'absence de données observées ou publiées montrant que le solvant/véhicule choisi n'induit pas d'aberrations chromosomiques ou d'autres effets délétères,

des animaux témoins non traités sont également inclus à chaque moment de prélèvement afin d'établir l'acceptabilité du témoin contenant le véhicule.

PROCÉDURE

Nombre d'animaux

19. La taille des groupes au début de l'étude doit permettre de disposer d'au moins cinq animaux mâles dans chaque groupe. Ce nombre d'animaux par groupe est considéré comme suffisant pour fournir une efficacité statistique idoine (c'est-à-dire généralement capable de détecter au moins un doublement de la fréquence des aberrations chromosomiques lorsque le niveau du témoin négatif est de 1,0 % ou plus assorti d'une probabilité de 80 % à un niveau de signification de 0,05) (3) (11). À titre d'information, concernant les exigences relatives au nombre maximum d'animaux généralement utilisés, une étude comptant deux moments de prélèvement et impliquant trois groupes de traitement, un groupe de témoins négatifs concomitants et un groupe de témoins positifs (chaque groupe étant composé de cinq animaux) nécessitera 45 animaux.

Déroulement du traitement

20. Les produits chimiques d'essai sont habituellement administrés une seule fois (c'est-à-dire en un seul traitement). D'autres régimes de dosage sont acceptables pour autant qu'ils soient scientifiquement justifiés.
21. Dans le groupe qui reçoit la dose la plus forte, les prélèvements sont effectués à deux intervalles après le traitement. Étant donné que le temps requis par l'absorption et la métabolisation du ou des produits chimiques d'essai, ainsi que leur effet sur la cinétique du cycle cellulaire peuvent influencer sur le moment optimal pour la détection des aberrations chromosomiques, deux prélèvements sont donc effectués, le premier, précoce aux environs de 24 heures et le deuxième, tardif, autour de 48 heures après le traitement. S'agissant des niveaux de dose inférieurs à la dose la plus élevée, il convient de choisir un intervalle de prélèvement précoce de 24 heures (soit une durée inférieure ou égale à la durée du cycle cellulaire d'une spermatogonie B, ce qui optimise ainsi la probabilité de pouvoir analyser les premières métaphases post-traitement), à moins que l'on sache qu'il existe un autre délai de prélèvement justifié et plus propice à la détection des effets.
22. D'autres moments de prélèvement peuvent être retenus. Par exemple, dans le cas des produits chimiques susceptibles de provoquer des effets indépendants de la phase S, il peut être judicieux d'effectuer des prélèvements plus précoces (soit à un intervalle de moins de 24 heures).
23. Un régime de traitement à doses répétées peut être employé notamment dans les cas où cet essai est associé à un test sur un autre effet mesuré dont la période d'administration est de 28 jours (par exemple, la méthode d'essai B.58). Le cas échéant, cependant, des groupes d'animaux

supplémentaires seront requis afin de tenir compte des différents délais de prélèvement. Par conséquent, le caractère approprié d'un tel programme doit être justifié sur le plan scientifique au cas par cas.

24. Avant l'euthanasie, les animaux reçoivent une dose appropriée d'un inhibiteur du fuseau (par exemple le Colcemid® ou la colchicine) par injection intrapéritonéale. Les échantillons sont prélevés après des délais appropriés. Pour les souris et les rats, ce délai est compris approximativement entre 3 et 5 heures.

Niveaux de dose

25. Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables pour orienter le choix des doses, cette étude préliminaire doit être effectuée dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale, conformément aux recommandations relatives aux études de détermination des doses (12). L'étude devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose entraînant de légers effets toxiques dans le cadre de la durée de l'étude (par exemple, en induisant un comportement ou des réactions anormales, une baisse mineure du poids corporel ou une cytotoxicité du système hématopoïétique) mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant une euthanasie de l'animal (13).
26. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans les cellules de spermatogonies (par exemple une diminution du rapport entre le nombre de mitoses des spermatogonies et le nombre des métaphases I et II de la méiose. Cette diminution ne doit cependant pas dépasser 50 %).
27. Les produits chimiques d'essai ayant une activité biologique spécifique à des niveaux de doses faibles et non toxiques (telles que les hormones et les mitogènes) et les produits chimiques qui présentent une saturation des propriétés toxicocinétiques peuvent être considérés comme des exceptions aux critères de détermination des doses et sont évalués au cas par cas.
28. Pour permettre d'obtenir des informations sur la relation dose-réponse, une étude complète doit comporter un groupe témoin négatif (paragraphe 18) et au moins trois niveaux de doses, espacés en général d'un facteur de 2, mais pas de plus de 4. Si le produit chimique d'essai ne provoque aucune toxicité dans le cadre d'une étude de détermination des doses, ou d'après les données disponibles, la dose la plus élevée pour une administration unique doit être de 2 000 mg/kg de poids corporel. Néanmoins, si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, la dose administrée la plus élevée devra correspondre à la DMT et les niveaux de dose employés devront de préférence s'étendre de la dose maximale à une dose induisant peu ou pas de toxicité. Lorsqu'une toxicité sur le tissu cible (testicule) est observée à tous les niveaux de doses administrés, il est conseillé de procéder à des études complémentaires à des doses non toxiques. Les études visant à caractériser davantage les informations sur la relation quantitative dose-réponse peuvent nécessiter un ou plusieurs groupes de traitement supplémentaires. Enfin,

ces limites peuvent varier pour certains types de produits chimiques d'essai (par exemple les produits pharmaceutiques à usage humain) faisant l'objet d'exigences spécifiques. Si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, il conviendra de choisir la dose limite ainsi que deux niveaux de doses inférieurs à cette dernière (tel que décrit ci-dessus). Pour une période d'administration égale ou supérieure à 14 jours, la dose limite est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, et pour des périodes d'administration de moins de 14 jours, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour.

Administration des doses

29. Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, l'implantation ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse et orale (par gavage) sont autant de choix qui peuvent être considérés comme justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du tissu cible. L'injection intrapéritonéale n'est normalement pas recommandée sauf si elle est scientifiquement justifiée car la cavité péritonéale n'est généralement pas une voie d'exposition humaine physiologiquement pertinente. Si le produit chimique d'essai est mélangé à l'alimentation ou à l'eau de boisson, surtout dans le cas d'un dosage unique, il convient de s'assurer que le délai entre l'absorption de nourriture et d'eau et le prélèvement est suffisant pour permettre une détection des effets (voir paragraphe 33). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Le volume ne doit normalement pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où un maximum de 2 ml/100 g est acceptable. L'administration de volumes plus importants (si la législation relative au bien-être animal le permet) doit être justifiée. Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant par rapport au poids corporel à tous les niveaux de doses.

Observations

30. Les animaux d'essai font l'objet d'un examen clinique général. Les signes cliniques doivent être consignés au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration. Au moins deux fois par jour, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Tous les animaux doivent être pesés au début de l'étude, au moins une fois par semaine au cours des études à doses répétées, puis lors de l'euthanasie. Pour les études dont la durée est égale ou supérieure à une semaine, la consommation de nourriture doit également être mesurée au moins une fois par semaine. Si le produit chimique d'essai est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai (13).

Préparation des chromosomes

31. Des cellules germinales en suspension obtenues à partir de l'une ou des deux testicules immédiatement après l'euthanasie sont exposées à une solution hypotonique et fixées selon les protocoles établis (2) (14) (15) par exemple). Les cellules sont alors étalées sur des lames et colorées (16) (17). Toutes les lames doivent être codées afin que leur identité ne soit pas révélée à l'examineur.

Analyse

32. Il y a lieu d'examiner au moins 200 cellules en métaphase bien étalées pour chaque animal (3) (11). Si la fréquence des témoins négatifs historiques est $<1\%$, il convient alors d'examiner plus de 200 cellules/animal afin d'augmenter l'efficacité statistique (3). Le recours à des méthodes de coloration permettant l'identification du centromère est conseillé.
33. Il convient de consigner séparément les aberrations chromatidiques et chromosomiques et de les classer par sous-catégories (cassures, échanges). Les lacunes sont enregistrées mais non prises en compte pour déterminer si un produit chimique induit une hausse notable de l'incidence des cellules porteuses d'aberrations chromosomiques. Les procédures en cours dans le laboratoire doivent assurer que l'analyse des aberrations chromosomiques est réalisée par des examinateurs qualifiés. Étant donné que les procédures de préparation des lames provoquent souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, entraînant une perte de chromosomes, toutes les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal ou supérieur à $2n \pm 2$, n étant le nombre haploïde de chromosomes pour cette espèce.
34. Bien que l'essai soit destiné à détecter les aberrations chromosomiques structurales, il est important de rapporter la fréquence des cellules polyploïdes et de celles présentant des chromosomes endoredupliqués le cas échéant (voir paragraphe 44).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

35. Les résultats individuels pour chaque animal sont présentés sous forme de tableaux. Le nombre de cellules présentant une (des) aberration(s) chromosomique(s) structurale(s) et le nombre d'aberrations chromosomique(s) par cellule doivent être évalués pour chaque animal. Les aberrations chromatidiques et chromosomiques classées par sous-catégorie (cassure, échange) doivent être consignées séparément, avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes traités et les groupes témoins. Les lacunes sont enregistrées séparément. La fréquence des lacunes est rapportée mais n'est généralement pas incluse dans l'analyse de la fréquence totale des aberrations chromosomiques structurales. Le pourcentage de cellules polyploïdes et de cellules présentant des chromosomes endoredupliqués est rapporté le cas échéant.
36. Les données de toxicité et les signes cliniques tels que décrits dans le paragraphe 30 sont consignés dans le rapport.

Critères d'acceptabilité

37. Les critères suivants déterminent l'acceptabilité de l'essai:

- Les témoins négatifs utilisés simultanément induisent des réponses cohérentes avec les normes publiées pour les données relatives aux témoins négatifs historiques, qui se situent généralement entre $> 0\%$ et $\leq 1,5\%$ cellules comportant des aberrations chromosomiques, ainsi qu'avec les données des témoins historiques du laboratoire, le cas échéant (voir paragraphes 10 et 18).
- Les témoins positifs utilisés simultanément induisent des réponses cohérentes avec les normes publiées pour les données relatives aux témoins positifs historiques ou avec la base de données des témoins positifs historiques du laboratoire, le cas échéant et produisent une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (voir paragraphes 17, 18).
- Le nombre idoine de cellules et de doses est analysé (voir paragraphes 28 et 32).
- Les critères de sélection de la dose maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 25 et 26.

38. Lorsqu'on observe des mitoses ainsi que des méiose, il faut déterminer le rapport entre le nombre de mitoses des spermatogonies et le nombre de premières et secondes métaphases méiotiques pour tous les animaux traités et témoins négatifs, dans un échantillon total de 100 cellules en division par animal. Dans le cas où il s'agit uniquement de mitose, l'indice mitotique doit être déterminé dans au moins 1 000 cellules de chaque animal.

Évaluation et interprétation des résultats

39. Au moins trois groupes de traitement sont analysés pour obtenir des données suffisantes pour l'analyse de la relation dose-réponse.

40. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si:

- au moins une des doses d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;
- l'augmentation est liée à la dose pour au moins l'un des moments de prélèvement; et
- des résultats se situent à l'extérieur de la plage acceptable de données relatives aux témoins négatifs, ou des données relatives aux témoins négatifs historiques du laboratoire le cas échéant (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson).

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des aberrations chromosomiques dans les cellules de spermatogonies des animaux testés. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont

également disponibles dans la littérature (11) (18). Les méthodes statistiques employées considèrent l'animal comme unité expérimentale.

41. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si:

- aucune dose d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;
- aucune condition expérimentale n'a révélé une augmentation liée à la dose; et,
- l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la plage acceptable de données relatives aux témoins négatifs ou des données du laboratoire relatives aux témoins négatifs historiques, le cas échéant (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des aberrations chromosomiques dans les cellules de spermatogonies de l'animal testé. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (11) (18). Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité que le produit chimique puisse induire des aberrations chromosomiques à des stades de développement ultérieurs non étudiés, ou des mutations génétiques.

42. Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou clairement négative.

43. Si la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, et afin d'établir la signification biologique d'un résultat (par exemple, une augmentation faible ou marginale), les données doivent être soumises à un jugement d'experts et/ou faire l'objet de recherches supplémentaires à l'aide des données expérimentales existantes, en vérifiant par exemple si le résultat positif se situe en dehors de la plage acceptable des données relatives aux témoins négatifs ou des données des témoins négatifs historiques du laboratoire (19).

44. Dans de rares cas, même après de nouvelles investigations, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure que les résultats sont positifs ou négatifs; les résultats seront alors déclarés équivoques.

45. Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que le produit chimique d'essai est capable d'inhiber les processus mitotiques et d'induire des aberrations chromosomiques numériques (20). Une augmentation du nombre de cellules présentant des chromosomes endoredupliques peut indiquer que le produit chimique d'essai est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (21) (22), un mécanisme qui, bien que différent de l'inhibition des processus mitotiques, induit lui aussi des modifications du nombre de chromosomes (voir paragraphe 2). La fréquence des cellules polyploïdes et des cellules présentant des chromosomes endoredupliques doit donc être consignée séparément.

Rapport d'essai

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

Résumé.

Produit chimique d'essai:

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation, si elle est disponible;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue;
- solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;
- mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant:

- apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;
- 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:

- caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Préparation du produit chimique d'essai:

- justification du choix du véhicule;
- solubilité et stabilité du produit chimique dans le solvant/véhicule.
- préparation des formulations à administrer dans l'alimentation, l'eau de boisson ou par inhalation;
- déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple) le cas échéant;

Animaux d'essai:

- espèces/souches utilisées et justification;
- nombre et âge des animaux;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.;
- méthode d'identification individuelle des animaux;

- pour les études de courte durée: poids individuel des animaux au début et à la fin de l'essai ;
pour les études d'une durée supérieure à une semaine: poids individuel des animaux et consommation de nourriture. La plage des poids corporels, ainsi que la moyenne et l'écart type pour chaque groupe doivent également être mentionnés.

Conditions de l'essai:

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule);
- données issues de l'étude de détermination des doses, si elle a été réalisée;
- justification du choix des doses;
- justification du choix de la voie d'administration;
- détails sur la préparation du produit chimique d'essai;
- détails sur l'administration du produit chimique d'essai;
- justification du choix des délais de sacrifices;
- méthodes de mesure de la toxicité animale, y compris, si elles existent, analyses histopathologiques ou hématologiques et fréquence des observations animales et des mesures du poids corporel;
- méthodes permettant de vérifier que le produit chimique d'essai a atteint le tissu cible ou la circulation sanguine en cas de résultats négatifs;
- dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration (ppm) du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson, et de la consommation, s'il y a lieu;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau;
- description détaillée des programmes de traitement et de prélèvement et justification des choix;
- méthode d'euthanasie;
- méthode d'analgésie (le cas échéant);
- procédures d'isolement des tissus;
- nature et concentration de l'inhibiteur du fuseau, durée du traitement;
- méthodes de préparation des lames;
- critères d'analyse des aberrations;
- nombre de cellules analysées par animal;
- critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque.

Résultats:

- état de santé des animaux avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité;
- poids corporels et poids des organes, après euthanasie (si plusieurs traitements sont utilisés, poids corporels pendant le régime de traitement);
- signes de toxicité;
- indice mitotique;
- rapport des cellules de spermatogonies en mitose à celles se trouvant en premières et secondes métaphases méiotiques, ou autre preuve d'exposition du tissu cible;
- type et nombre d'aberrations, donnés séparément pour chaque animal;
- nombre total d'aberrations par groupe, moyenne et écart-type;
- nombre de cellules présentant des aberrations par groupe, moyenne et écart-type;
- relation dose-réponse, si possible;
- analyses et méthodes statistiques employées;
- données des témoins négatifs concomitants;
- données des témoins négatifs historiques, y compris les plages, les moyennes, les écarts types, et limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson (le cas échéant), ou données publiées relatives aux témoins historiques utilisées pour déterminer l'acceptabilité des résultats de l'essai;
- données des témoins positifs concomitants;
- modifications de la ploïdie, le cas échéant, y compris les fréquences de polyploïdie et/ou de cellules endoredupliquées.

*Discussion des résultats**Conclusions*

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, N° 234, OCDE, Paris
- (2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.
- (4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.
- (5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
- (7) Cattanaach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.
- (8) Cattanaach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.
- (9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.
- (10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313-324.
- (11) Adler I.-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19-30.

- (12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.
- (13) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19.), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207-209.
- (15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Environ. Mutagen.*, 1, 291-294.
- (16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, 289-294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.
- (19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87-90.
- (20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, *Mutation Res.*, 287, 29-46.
- (21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.
- (22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutation Res.*, 119, 403-413.

Appendice

DÉFINITIONS

Aneuploidy: any deviation from the normal diploid (or haploid) number of chromosomes by a single chromosome or more than one, but not by entire set(s) of chromosomes (polyploidy).

Centromere: Region(s) of a chromosome with which spindle fibers are associated during cell division, allowing orderly movement of daughter chromosomes to the poles of the daughter cells.

Produit chimique: une substance ou un mélange

Diversité chromosomique: diversité des formes de chromosomes (par exemple, métacentriques, acrocentriques, etc.) et de leur taille.

Aberration chromatidique: lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration chromosomique: lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Clastogène: produit chimique induisant des aberrations chromosomiques structurales dans des populations de cellules ou d'organismes.

Lacune: lésion achromatique inférieure à la largeur d'une chromatide, avec un défaut d'alignement minimal des chromatides.

Génotoxique: terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, délétions, adduits, liaisons et modifications de nucléotides, réarrangements, mutations, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Indice mitotique (IM): nombre de cellules en métaphase divisé par le nombre total de cellules dans une population; une indication de la vitesse de prolifération cellulaire dans cette population.

Mitose: division du noyau cellulaire, généralement décomposée en prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase.

Mutagène: qui produit une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Aberration numérique: modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des animaux employés.

Polyploïdie: état multiple du nombre de chromosomes haploïde (n), autre que le nombre diploïde (c'est-à-dire $3n$, $4n$, etc.).

Aberration structurale: modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope des cellules au stade de la métaphase et apparaissant sous la forme de délétions, cassures et échanges.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

UVCB: substances chimiques de composition inconnue ou variables, produits de réaction complexes et matières biologiques».

(5) Dans la partie B, le chapitre B.40 est remplacé par le texte suivant;

«B.40 CORROSION CUTANEE *IN VITRO*: ESSAI DE RESISTANCE ELECTRIQUE TRANSCUTANEE (RET)

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 430 (2015) de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions irréversibles de la peau, qui se manifestent par une nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'un produit chimique d'essai [selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1) et du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (ci-après le «règlement CLP»¹]. La présente version mise à jour de la méthode d'essai B.40 propose une procédure *in vitro* permettant d'identifier les substances et mélanges corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU (1) et du règlement CLP.
2. Traditionnellement, l'évaluation de la corrosivité cutanée a impliqué le recours à des animaux de laboratoire (méthode d'essai B.4, équivalente à la ligne directrice 404 de l'OCDE, initialement adoptée en 1981 et révisée en 1992, 2002 et 2015) (2). Outre la présente méthode d'essai B.40, d'autres méthodes d'essai *in vitro* pour tester le potentiel de corrosion de la peau des produits chimiques ont été validées et adoptées, à savoir la méthode d'essai B.40 *bis*, équivalente à la ligne directrice 431 de l'OCDE (3) et la méthode d'essai B.65 (équivalente à la ligne directrice 435 de l'OCDE) (4), et sont capables d'identifier les sous-catégories de produits chimiques corrosifs quand cela est requis. Plusieurs méthodes d'essai *in vitro* validées ont été adoptées, notamment la ligne directrice B.46 (équivalente à la ligne directrice 439 de l'OCDE) (5), aux fins de tester l'irritation de la peau. Un document guide de l'OCDE sur les approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation IATA en anglais pour l'irritation et la corrosion de la peau propose une approche modulaire pour les tests d'irritation et de corrosion de la peau. L'approche intégrée décrit plusieurs modules qui regroupent les sources d'information et les outils d'analyse, et fournit des guides sur la façon i) d'intégrer et d'utiliser les informations

¹ Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2008, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

existantes sur les données d'essai et autres données pour l'évaluation du potentiel irritant et corrosif pour la peau des produits chimiques d'essai, et ii) propose une approche dans les cas où des tests supplémentaires sont recommandés (6).

3. La présente méthode d'essai porte sur le danger de corrosion cutanée pour la santé humaine. Elle s'appuie sur la méthode d'essai de résistance électrique transcutanée (RET) pratiquée sur un épiderme de rat, laquelle utilise des disques cutanés pour identifier les produits chimiques corrosifs sur la base de leur capacité à provoquer la perte de l'intégrité du *stratum corneum* normal et de la fonction de barrière. La présente méthode d'essai a été initialement adoptée en 2004 et mise à jour en 2015 pour faire référence au document guide IATA.
4. En vue d'évaluer les essais de corrosion cutanée *in vitro* à des fins réglementaires, des études de pré-validation (7) ont été réalisées, suivies d'une étude formelle de validation de la méthode d'essai de RET sur peau de rat axée sur la corrosion cutanée (8) (9) (10) (11). Sur la base des résultats de ces études, il est désormais recommandé que la méthode d'essai de RET (désignée comme la méthode de référence validée – MRV –) puisse servir, à des fins réglementaires, à évaluer la corrosivité cutanée *in vivo* (12) (13) (14).
5. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode d'essai *in vitro* de RET (corrosivité cutanée) similaire ou modifiée autre que la MRV, il convient d'en déterminer la fiabilité, la pertinence (précision) et les limitations pour l'usage préconisé, afin de s'assurer de sa similitude avec la MRV, conformément aux normes de performance (15). L'acceptation mutuelle des données ne sera garantie qu'après examen et intégration de toute méthode d'essai nouvelle ou actualisée proposée dans la ligne directrice d'essai correspondante de l'OCDE.

DÉFINITIONS

6. Les définitions utilisées figurent à l'appendice 1.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

7. Selon une étude de validation (10) et d'autres études publiées (16) (17), la méthode d'essai de RET sur peau de rat permet de faire la distinction entre produits corrosifs et produits non corrosifs pour la peau avec une sensibilité globale de 94 % (51/54) et une spécificité de 71 % (48/68) pour une base de données de 122 substances.
8. La présente méthode d'essai se rapporte au volet « corrosion cutanée *in vitro* ». Elle permet d'identifier les produits chimiques d'essai corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU/du règlement CLP. Une limite de cette méthode d'essai, comme l'ont montré les études de validation (8) (9) (10) (11), est qu'elle ne permet pas de classer en sous-catégories les substances et mélanges corrosifs conformément au SGH de l'ONU/règlement CLP. Son utilisation sera fonction de la réglementation en vigueur. Si la présente méthode d'essai ne fournit pas d'informations appropriées sur l'irritation cutanée, on notera en revanche que la

méthode d'essai B.46 porte spécifiquement sur les essais d'irritation cutanée *in vitro* (5). Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux après une exposition unique, le document guide IATA (6) devra être consulté.

9. Les essais réalisés dans le cadre de l'étude de validation sous-tendant cette méthode d'essai ont porté sur un large éventail de produits chimiques représentant principalement des substances; la base de données empiriques de cette étude totalisait 60 substances couvrant une grande variété de classes chimiques (8) (9). D'après l'ensemble des données disponibles, cette méthode d'essai peut être utilisée pour tester un large éventail de classes chimiques et d'états physiques, notamment des liquides, des semi-solides, des solides et des cires. Cependant, étant donné que pour certains états physiques, les éléments d'essai pour lesquels il existe des données de référence appropriées ne sont pas facilement disponibles, on notera qu'un nombre relativement restreint de cires et de matières solides corrosives ont été évaluées durant la validation. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que les méthodes d'essai figurant dans cette méthode d'essai ne peuvent s'appliquer à une catégorie donnée de substances, il convient de ne pas utiliser cette méthode d'essai pour tester la catégorie de substances en question. De plus, outre les substances, cette méthode d'essai est présumée pouvoir s'appliquer aux mélanges. Or, les mélanges couvrant un large éventail de catégories et de compositions, et compte tenu des informations limitées disponibles actuellement à propos des essais de mélanges, dans les cas où l'on peut apporter la preuve que cette méthode d'essai ne peut s'appliquer à une catégorie donnée de mélanges (par exemple selon la stratégie proposée par Eskes *et al.*, 2012) (18), la méthode d'essai ne doit pas être utilisée pour tester la catégorie de mélanges en question. Avant d'utiliser la présente méthode d'essai pour tester un mélange afin de générer des données dans un but réglementaire, il convient de s'assurer et de justifier le cas échéant, que les données générées seront adéquates. De telles dispositions ne sont pas nécessaires quand il existe une exigence réglementaire de tester le mélange. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'études de validation (8) (9). Bien qu'il soit envisageable de pouvoir tester des gaz et des aérosols en faisant appel à la méthode d'essai de RET, l'actuelle méthode d'essai ne permet pas de tester les produits de ce type.

PRINCIPE DE L'ESSAI

10. Le produit chimique d'essai est appliqué pour une durée n'excédant pas 24 heures sur la surface épidermique de disques de peau, placés dans un système d'essai à deux compartiments pour lequel les disques de peau font office de séparation entre les compartiments. Ces disques cutanés sont prélevés sur la peau de jeunes rats âgés de 28 à 30 jours et euthanasiés. Les produits chimiques corrosifs sont identifiés sur la base de leur capacité à provoquer la perte de l'intégrité du *stratum corneum* normal et de la fonction de barrière, cette perte étant mesurée comme une diminution de la RET en deçà d'une valeur seuil (16) (paragraphe 32). Dans le cas de l'épiderme de rat, une valeur de seuil de la RET de 5 kΩ a été retenue, sur la base de nombreuses données relatives à un large éventail de substances, desquelles il ressortait que

l'immense majorité des valeurs étaient soit très supérieures (souvent $> 10 \text{ k}\Omega$), soit très inférieures (souvent $< 3 \text{ k}\Omega$) à cette valeur de seuil (16). De manière générale, les produits chimiques non corrosifs sur les animaux, mais irritants ou non irritants, ne font pas baisser la RET en dessous de ce seuil. Par ailleurs, l'utilisation d'autres préparations de peau ou d'autres équipements est susceptible de modifier la valeur de seuil, ce qui impose de procéder à une validation supplémentaire.

11. Une étape de fixation d'un colorant est incorporée dans la procédure d'essai pour confirmer les résultats positifs de la RET présentant des valeurs autour de $5 \text{ k}\Omega$. Cette étape de fixation d'un colorant détermine en effet si l'accroissement de la perméabilité ionique est imputable à la destruction physique du *stratum corneum*. Dans la pratique, la méthode de l'essai de RET sur peau de rat prédit très bien la corrosivité *in vivo* sur le lapin évalué dans la méthode d'essai B.4 de l'OCDE (2).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

12. Avant d'appliquer en routine la méthode de RET sur peau de rat à la présente méthode d'essai, les laboratoires font la preuve de leur compétence technique en classifiant correctement les douze substances recommandées dans le tableau 1. Dans le cas où une substance ne serait pas disponible ou dans les cas où cela se justifie, une autre substance pour laquelle il existe des données de référence *in vivo* et *in vitro* peut être utilisée (par exemple en choisissant dans la liste des produits chimiques de référence (16)), pourvu que les mêmes critères de sélection tels que décrits dans le tableau 1 soient appliqués.

Tableau 1: Liste des substances d'épreuve de compétence¹

Substance	Numéro CAS	Classe chimique ²	Cat. SGH de l'ONU/du CLP d'après les résultats <i>in vivo</i> ³	Cat. MRV d'après les résultats <i>in vitro</i>	État physique	pH ⁴
Substances corrosives <i>in vivo</i>						
N,N'-diméthyl dipropylènetriamine	10563-29-8	base organique	1A	6 x C	L	8,3
Diamino-1,2 propane	78-90-0	base organique	1A	6 x C	L	8,3
Acide sulfurique (10 %)	7664-93-9	acide inorganique	(1A)/1B/1C	5 x C 1 x NC	L	1,2
Hydroxyde de potassium (solution)	1310-58-3	acide inorganique	(1A)/1B/1C	6 x C	L	13,2
Acide octanoïque (caprylique)	124-07-2	acide organique	1B/1C	4 x C 2 x NC	L	3,6
2-tert-butylphénol	88-18-6	phénol	1B/1C	4 x C 2 x NC	L	3,9

Substance	Numéro CAS	Classe chimique ²	Cat. SGH de l'ONU/du CLP d'après les résultats <i>in vivo</i> ³	Cat. MRV d'après les résultats <i>in vitro</i>	État physique	pH ⁴
Substances non corrosives <i>in vivo</i>						
Acide isostéarique	2724-58-5	acide organique	NC	6 x NC	L	3,6
4-amino-1,2,4-triazole	584-13-4	base organique	NC	6 x NC	S	5,5
Bromure de phénétyle	103-63-9	électrophile	NC	6 x NC	L	3,6
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	3446-89-7	électrophile	NC	6 x NC	L	6,8
1,9-décadiène	1647-16-1	organique neutre	NC	6 x NC	L	3,9
tétrachloréthylène	127-18-4	organique neutre	NC	6 x NC	L	4,5

Abréviations: aq = aqueux; CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service; MRV = méthode de référence validée; ND = non déterminé.

¹Ces substances d'épreuve de compétence, d'abord classées en substances corrosives et non corrosives, puis par sous-catégorie de substances corrosives, puis par classe chimique, ont été choisies parmi les substances utilisées dans l'étude de validation du CEVMA de la méthode d'essai de RET sur peau de rat (8) (9). Sauf cas contraire, les substances ont été testées au niveau de pureté obtenu pour les substances en provenance du commerce (9). Cette sélection inclut, dans la mesure du possible, des substances qui: (i) sont représentatives de la gamme des réactions de corrosion provoquées (par exemple non corrosives; faiblement à fortement corrosives) que la MRV est capable de mesurer ou de prévoir; (ii) sont représentatives des classes chimiques utilisées dans l'étude de validation; (iii) reflètent les caractéristiques de performance de la MRV; (iv) ont une structure chimique bien définie; (v) permettent d'obtenir des résultats définitifs avec la méthode d'essai *in vivo* de référence; (vi) sont disponibles dans le commerce et (vii) ne sont pas associées à des coûts d'élimination prohibitifs).

²Classe chimique assignée par Barratt et al. (8).

³Les groupes d'emballage de l'ONU correspondants sont les groupes I, II et III respectivement pour les catégories 1A, 1B et 1C du SGH de l'ONU/du règlement CLP.

⁴Les valeurs de pH ont été tirées de Fentem *et al.* (9) et Barratt *et al.* (8).

PROCÉDURE

- Il existe des modes opératoires normalisés pour la méthode d'essai de RET sur peau de rat (corrosion cutanée) (19). Les méthodes d'essai de RET sur épiderme de rat couvertes par cette méthode d'essai doivent se conformer aux critères suivants:

Animaux

- Il convient d'utiliser des rats parce que la sensibilité de leur épiderme aux substances de cette méthode d'essai a été prouvée (12) et qu'il s'agit de la seule source de peau ayant été validée

formellement (8) (9). L'âge (au moment du prélèvement de la peau) et la souche utilisée sont des critères déterminants, puisqu'il est essentiel que les follicules pileux soient en phase dormante avant le début de la pousse de la fourrure adulte.

15. Les poils du dos et des flancs des jeunes rats (Wistar ou souche comparable) mâles ou femelles, âgés approximativement de 22 jours, sont soigneusement coupés à l'aide d'une petite tondeuse. Les animaux sont ensuite nettoyés soigneusement avec un linge humide, la zone tondue étant plongée dans une solution antibiotique (contenant, par exemple, de la streptomycine, de la pénicilline, du chloramphénicol et de l'amphotéricine à des concentrations efficaces pour inhiber la croissance bactérienne). Les animaux sont lavés une nouvelle fois avec des antibiotiques le troisième ou le quatrième jour après le premier lavage, et doivent ensuite être utilisés dans un délai de 3 jours, lorsque le *stratum corneum* a récupéré de la tonte.

Préparation des disques cutanés

16. Les animaux, âgés de 28 à 30 jours (cet âge est particulièrement important) sont euthanasiés. On prélève la peau dorso-latérale de chaque animal et on la débarrasse soigneusement du tissu adipeux en excès. Des disques cutanés, d'un diamètre approximatif de 20 mm chacun sont prélevés. La peau peut être stockée avant d'utiliser les disques lorsqu'il est établi que les données de contrôle positif et négatif sont équivalentes à celles obtenues avec de la peau fraîche.
17. Chaque disque cutané est placé sur l'extrémité d'un tube PTFE (polytétrafluoroéthylène) en veillant à ce que la surface épidermique soit en contact avec le tube. Après avoir ajusté de force un joint torique en caoutchouc sur l'extrémité du tube pour maintenir la peau en place, on coupe le tissu excédentaire. Le joint torique en caoutchouc est ensuite soigneusement fixé de manière étanche à l'extrémité du tube PTFE à l'aide de vaseline. Le tube est introduit dans une chambre réceptrice contenant une solution de sulfate de magnésium (154 mM) dans lequel il est maintenu par une pince à ressort (figure 1). Le disque cutané doit être complètement immergé dans la solution de sulfate de magnésium (MgSO_4). Entre 10 et 15 disques cutanés peuvent être prélevés de la peau d'un rat. Les dimensions du tube et du joint torique sont indiquées à la figure 2.
18. Avant le début de l'essai proprement dit, on mesure, pour chaque peau de rat, la RET de deux disques cutanés, à titre de contrôle de la qualité. Pour que les autres disques d'une même peau soient valables pour la méthode d'essai, il faut que les deux disques donnent des valeurs de résistance électrique supérieures à 10 k Ω . Si la résistance est inférieure à 10 k Ω , les disques restants provenant de la même peau doivent être éliminés.

Application du produit chimique d'essai et substances de contrôle

19. Pour chaque essai, des substances de contrôle positif et négatif doivent être utilisées parallèlement au produit chimique d'essai, de façon à garantir la qualité des résultats du modèle expérimental. Chaque essai doit être réalisé en utilisant les disques de peau provenant d'un seul

et même animal. Les substances de contrôle positif et négatif recommandées sont respectivement l'acide chlorhydrique 10 M et l'eau distillée.

20. Les produits chimiques liquides testés (150 μ l) sont appliqués sur la surface épidermique à l'intérieur du tube. Pour l'essai de produits chimiques solides, une quantité suffisante du solide est appliquée uniformément sur le disque de peau, de façon à ce que la totalité de la surface de l'épiderme soit couverte. Après avoir ajouté de l'eau désionisée (150 μ l) sur les solides, on agite le tube doucement. Afin d'optimiser le contact avec la peau, certains solides doivent être chauffés à 30 °C pour dissoudre le produit chimique d'essai ou être broyés pour obtenir des grains ou une poudre.
21. On utilise trois disques cutanés pour chaque produit chimique d'essai à chaque expérience. Ces produits chimiques d'essai sont appliqués pendant 24 heures à une température de 20 à 23 °C, puis éliminés par lavage sous l'eau du robinet à température ambiante.

Mesures de la RET

22. L'impédance de la peau, c'est-à-dire la RET, est mesurée à l'aide d'un pont de mesure de Wheatstone en courant alternatif basse tension (18), présentant les caractéristiques suivantes: tension de 1 à 3 Volts, courant alternatif de forme sinusoïdale ou rectangulaire compris entre 50 et 1 000 Hz, et une plage de mesure minimale entre 0.1 et 30 k Ω . Le pont de mesure utilisé dans l'étude de validation permettait de mesurer l'inductance, la capacitance et la résistance jusqu'à des valeurs respectivement de 2 000 H, 2 000 μ F et 2 M Ω , à des fréquences de 100 Hz ou 1 kHz, en utilisant des valeurs en parallèle ou en série. Pour les besoins de l'essai RET de corrosivité, les mesures sont enregistrées en résistance, à une fréquence de 100 Hz et à l'aide de valeurs en série. Avant la mesure de la résistance électrique, on réduit la tension de surface de la peau en ajoutant un volume suffisant d'éthanol à 70 % pour couvrir l'épiderme. Après quelques secondes, on enlève l'éthanol du tube, puis on hydrate le tissu par l'addition de 3 ml d'une solution de sulfate de magnésium (154 mM). Les électrodes du pont de mesure sont placées de part et d'autre du disque cutané pour prendre la mesure de la résistance en k Ω /disque cutané (figure 1). Les dimensions des électrodes et la longueur d'électrode exposée sous les pinces crocodiles sont indiquées à la figure 2. La pince maintenant l'électrode intérieure repose sur la partie supérieure du tube PTFE pendant la mesure de la résistance, afin que la longueur d'électrode immergée dans la solution de sulfate de magnésium reste constante. L'électrode extérieure est introduite dans le compartiment receveur de manière à reposer sur le fond de celui-ci. La distance entre la pince à ressort et la partie inférieure du tube PTFE est maintenue constante (figure 2), cette distance influençant la valeur de résistance obtenue. Par conséquent, la distance entre l'électrode intérieure et le disque cutané doit être constante et minimale (1 à 2 mm).
23. Il convient de noter que si la valeur de résistance mesurée est supérieure à 20 k Ω , ceci peut être dû au fait que des restes du produit chimique d'essai couvrent la surface épidermique du disque de peau. On peut essayer de retirer davantage de produit chimique d'essai, par exemple en

fermant de façon étanche le tube PTFE avec le pouce revêtu d'un gant et en l'agitant pendant 10 secondes environ. On élimine ensuite la solution de sulfate de magnésium et on répète la mesure de la résistance avec une nouvelle solution de sulfate de magnésium.

24. Les caractéristiques et dimensions de l'appareil d'essai et de la procédure expérimentale peuvent avoir une incidence sur les valeurs de RET obtenues. Le seuil de corrosivité de 5 k Ω a été défini sur la base des données obtenues à partir de l'appareil et de la procédure spécifiques décrits dans cette méthode d'essai. Avec un autre équipement ou dans des conditions d'essai différentes, les valeurs de seuil et de contrôle peuvent être différentes. Par conséquent, il est nécessaire d'étalonner la méthodologie et la valeur de seuil de résistance en testant différentes substances d'épreuve de compétence, choisis parmi ceux utilisés dans l'étude de validation (8)(9), ou dans des classes chimiques équivalentes à celles des substances étudiées. Un ensemble de substances d'épreuve de compétence est présenté au tableau 1.

Méthodes avec fixation d'un colorant

25. L'exposition à certains produits chimiques non corrosifs peut entraîner une réduction de la résistance sous la valeur de seuil de 5 k Ω , permettant ainsi le passage d'ions à travers le *stratum corneum*, ce qui réduit ainsi la résistance électrique (9). Par exemple, les substances organiques neutres et les substances tensio-actives (détergents, émulsifiants et autres agents de surface) peuvent évacuer les lipides de la peau et accroître la perméabilité aux ions de la barrière cutanée. En conséquence, si les valeurs de RET obtenues avec ces produits chimiques sont inférieures à, ou proches de, 5 k Ω , en l'absence de toute lésion visible sur les disques cutanés, une étude de pénétration d'un colorant doit être menée sur les tissus traités et de contrôle, afin de déterminer si ces valeurs de RET résultent d'une perméabilité accrue ou d'une corrosion de la peau (7) (9). S'il s'agit d'une corrosion, autrement dit si le *stratum corneum* est rompu, le colorant sulforhodamine B appliqué à la surface de la peau pénètre rapidement et teinte les tissus sous-jacents. Ce colorant reste stable au contact d'un large éventail de substances et n'est pas affecté par la procédure d'extraction décrite ci-après.

Application et élimination du colorant Sulforhodamine B

26. Après l'essai de RET, le sulfate de magnésium est évacué du tube et la peau est soigneusement examinée. Si aucune lésion majeure n'est visible (par exemple une perforation), 150 μ l d'une dilution à 10 % (p/v) de sulforhodamine B (Acid Red 52; C.I. 45100; numéro CAS 3520-42-1) dans de l'eau distillée sont appliqués sur la surface épidermique de chaque disque pendant 2 heures. Les disques cutanés sont lavés ensuite sous un jet d'eau courante à température ambiante pendant environ 10 secondes pour éliminer le colorant excédentaire ou non fixé. Chaque disque cutané est soigneusement enlevé du tube PTFE et placé dans un flacon (par exemple un flacon à scintillation en verre de 20 ml) contenant de l'eau désionisée (8 ml). Les flacons sont agités doucement pendant 5 minutes pour éliminer complètement tout colorant excédentaire ou non fixé. Après avoir répété l'opération de rinçage, on enlève les disques cutanés et on les place dans des flacons contenant 5 ml de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 30 % (p/v) dans de l'eau distillée, puis on les incube pendant une nuit à 60 °C.

27. Après incubation, chaque disque de peau est retiré et jeté, et la solution restante est centrifugée pendant 8 minutes à 210 °C (force centrifuge relative $\sim 175 \times g$). Un échantillon de 1 ml de surnageant est ensuite dilué dans un rapport de 1 à 5 (v/v) [soit 1 ml + 4 ml] avec du SDS à 30 % (p/v) dans de l'eau distillée. La densité optique (DO) de la solution est mesurée à environ 565 nm.

Calcul de la teneur en colorant

28. La teneur de chaque disque en colorant sulforhodamine B est calculée sur la base des valeurs de DO (9) (coefficient d'extinction molaire de la sulforhodamine B à 12 nm = $8,7 \times 10^4$; poids moléculaire = 580). La teneur en sulforhodamine B est déterminée pour chaque disque de peau à l'aide d'une courbe-étalon appropriée et on calcule ensuite une teneur moyenne en colorant pour les essais répétés.

Critères d'acceptabilité

29. Les valeurs moyennes de la RET sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles positifs et négatifs effectués parallèlement se situent dans les plages acceptables pour la méthode en laboratoire d'essai. Les plages acceptables de valeur de résistance pour la méthodologie et l'appareillage décrits ci-avant sont les suivantes:

Contrôle	Substance	Plage de résistance (k Ω)
Positif	Acide chlorhydrique 10 M	0,5 - 1.0
Négatif	Eau distillée	10 - 25

30. Les valeurs moyennes de la fixation du colorant sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles effectués parallèlement se situent dans la plage acceptable pour la méthode. Les plages acceptables de teneur en colorant pour les substances de contrôle proposées pour la méthodologie et l'appareillage décrits ci-avant sont indiquées dans le tableau suivant:

Contrôle	Substance	Plage de teneur en colorant ($\mu\text{g}/\text{disque}$)
Positif	Acide chlorhydrique 10 M	40 - 100
Négatif	Eau distillée	15 - 35

Interprétation des résultats

31. La valeur seuil de RET qui permet de distinguer les produits chimiques corrosifs des produits non corrosifs a été déterminée lors de l'optimisation de la méthode d'essai, testée durant une phase de pré-validation, puis confirmée dans le cadre d'une étude formelle de validation.
32. Le modèle prédictif de la méthode d'essai de RET sur épiderme de rat (9) (19), associé au système de classification du SGH de l'ONU/du règlement CLP, est le suivant:

On considère que le produit chimique d'essai est non corrosif pour la peau:

- i) si la valeur moyenne de la RET pour le produit chimique d'essai est supérieure à 5 k Ω , ou
- ii) si la valeur moyenne de la RET pour le produit chimique d'essai est inférieure ou égale ($\leq$) à 5 k Ω , et
- que les disques de peau ne montrent aucune lésion manifeste (par exemple une perforation), et
- que la teneur moyenne en colorant du disque est inférieure ($<$) à la teneur moyenne en colorant du disque de contrôle positif (acide hydrochlorique 10 M) obtenue parallèlement (pour connaître les plages acceptables, se reporter au paragraphe 30).

On considère que le produit chimique d'essai est corrosif pour la peau:

- i) si la valeur moyenne de la RET pour le produit chimique d'essai est inférieure ou égale ($\leq$) à 5 k Ω , et que les disques de peau montrent des lésions manifestes (par exemple une perforation), ou
 - ii) si la valeur moyenne de la RET pour le produit chimique d'essai est inférieure ou égale ($\leq$) à 5 k Ω , et
 - que les disques de peau ne montrent aucune lésion manifeste (par exemple une perforation), mais
 - que la teneur moyenne en colorant du disque est supérieure ou égale ($\geq$) à la teneur moyenne en colorant du disque de contrôle positif (acide hydrochlorique 10 M) obtenue parallèlement (pour connaître les plages acceptables, se reporter au paragraphe 30).
33. Une expérience réalisée à l'aide d'au moins trois réplicats de disques de peau devrait suffire pour tester un produit chimique dont la classification est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents réplicats et/ou une RET égale à 5 ± 0.5 k Ω , une seconde expérience indépendante est envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premiers.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

34. Les valeurs de résistance (k Ω) et les valeurs de teneur en colorant (μ g/disque), s'il y a lieu, pour le produit chimique d'essai et pour les contrôles positifs et négatifs doivent être présentées sous forme de tableau, et inclure les données de chaque réplicat de disque pour chaque expérience et les valeurs moyennes $\pm$ écart-type. Toutes les expériences reproduites doivent être consignées. Les lésions observées sur les disques de peau doivent être enregistrées pour chaque produit chimique d'essai.

Rapport d'essai

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

Produit chimique d'essai et substances de contrôle:

- Substance mono-constituant: identification chimique, notamment désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent;
- Substance multi-constituants, UVCB ou mélange: caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;
- Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
- Source et numéro de lot si disponible;
- Traitement du produit chimique d'essai ou de la substance de contrôle avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage);
- Stabilité du produit chimique d'essai, date de péremption, ou date de vérification analytique si disponible;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Animaux d'essai:

- Souche et sexe;
- âge au moment du prélèvement de peau;
- source, conditions d'hébergement, alimentation, etc.;
- détails de la préparation de la peau.

Conditions de l'essai:

- courbes d'étalonnage de l'appareil d'essai;
- courbes d'étalonnage des performances de l'essai de fixation d'un colorant, passe-bande utilisé pour mesurer les valeurs de DO, et plage de linéarité de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre), le cas échéant;
- détails de la procédure d'essai utilisée pour les mesures de la RET;
- détails de la procédure d'essai utilisée pour l'évaluation de la fixation du colorant, le cas échéant;
- doses d'essai utilisées, durée de la ou des périodes d'exposition et température(s) d'exposition;
- détails de la procédure de lavage utilisée après la période d'exposition;
- nombre de répliquats de disques de peau utilisés par produit chimique d'essai et par substance de contrôle (négatif et positif);
- description de toute modification de la procédure d'essai;
- référence aux données historiques du modèle, à savoir (liste non limitative):

- i) acceptabilité des valeurs de RET des contrôles positif et négatif (en $k\Omega$) par rapport aux plages de résistance des contrôles positif et négatif,
 - ii) acceptabilité des valeurs de la teneur en colorant des contrôles positif et négatif (en $\mu\text{g}/\text{disque}$) par rapport aux plages de teneur en colorant des contrôles positif et négatif,
 - iii) acceptabilité des résultats de l'essai par rapport à la variabilité historique entre réplicats de disques de peau;
- description des critères de décision/du modèle prédictif appliqués.

Résultats:

- présentation sous forme de tableau des valeurs de RET et de l'essai de fixation d'un colorant (le cas échéant), pour chaque produit chimique d'essai et substance de contrôle, pour chaque expérience et chaque réplicat de disque cutané (pour chaque animal et chaque échantillon de peau), moyennes, écarts-types et écarts-types relatifs;
- description de tous les effets observés;
- classification obtenue compte tenu du modèle prédictif/des critères de décision utilisés.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

- (1) United Nations (UN) (2013). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second Revised Edition, UN New York and Geneva, 2013. Available at: [\[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html\]](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html).
- (2) Chapitre B.4 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur la peau.
- (3) Chapitre B.40 *bis* de la présente annexe , Corrosion cutanée *in vitro*: Essai sur modèle de peau humaine.
- (4) Chapitre B.65 de la présente annexe, Méthode d'essai *in vitro* sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée.
- (5) Chapter B.46 of this Annex, Irritation cutanée *in vitro*: essai sur épiderme humain reconstitué.
- (6) OCDE (2014). Guidance document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (N° 203), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23, 219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro* 12, 483- 524.
- (10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops. *ATLA* 23, 129-147.

- (11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.
- (13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.
- (14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.
- (15) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N° 218. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 507-512.
- (17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro*: Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol. In Vitro* 6,191-194.
- (18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüscheweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.
- (19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

- (20) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

FIGURE1: APPAREIL POUR L'ESSAI DE RET SUR PEAU DE RAT

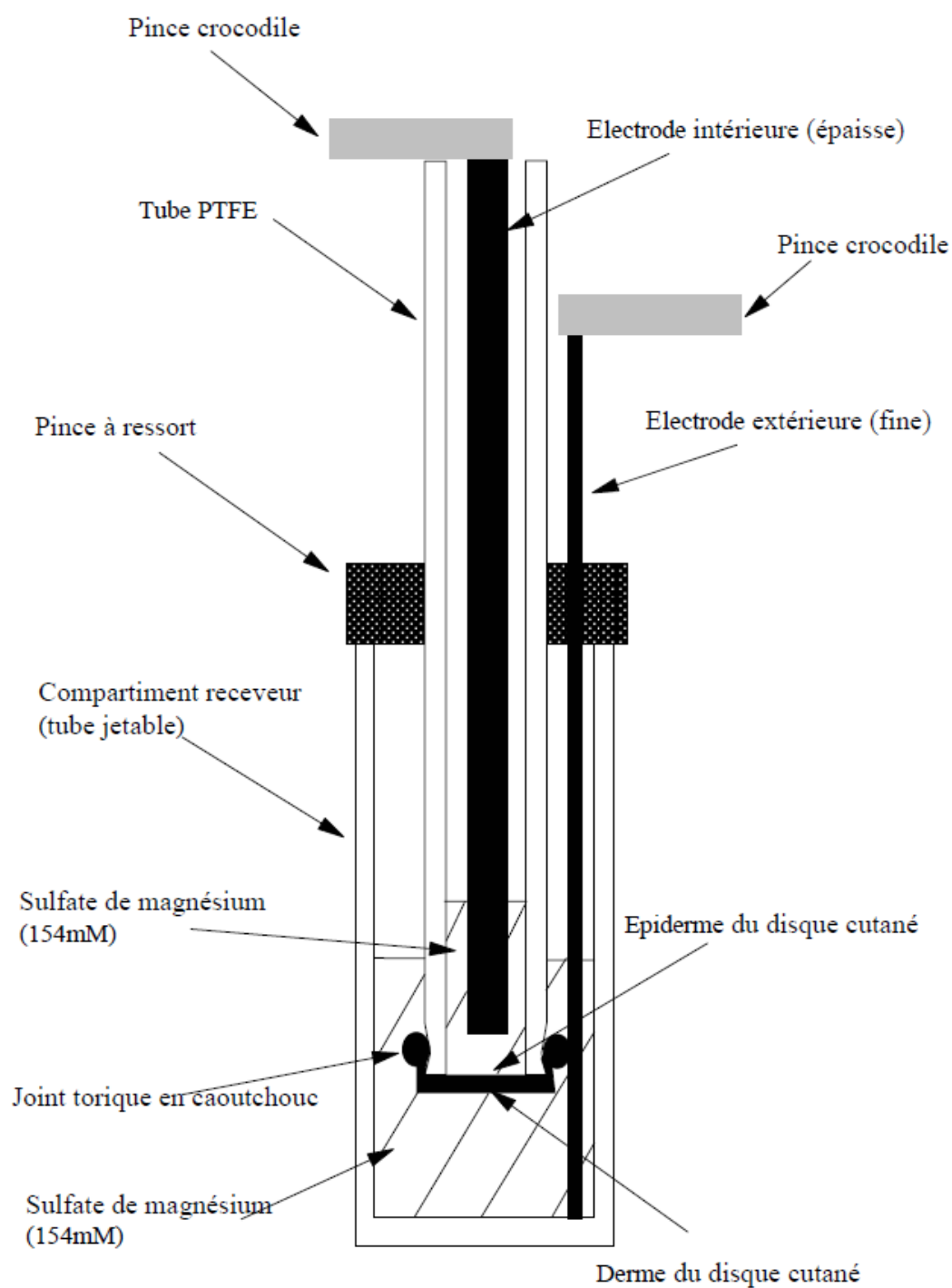
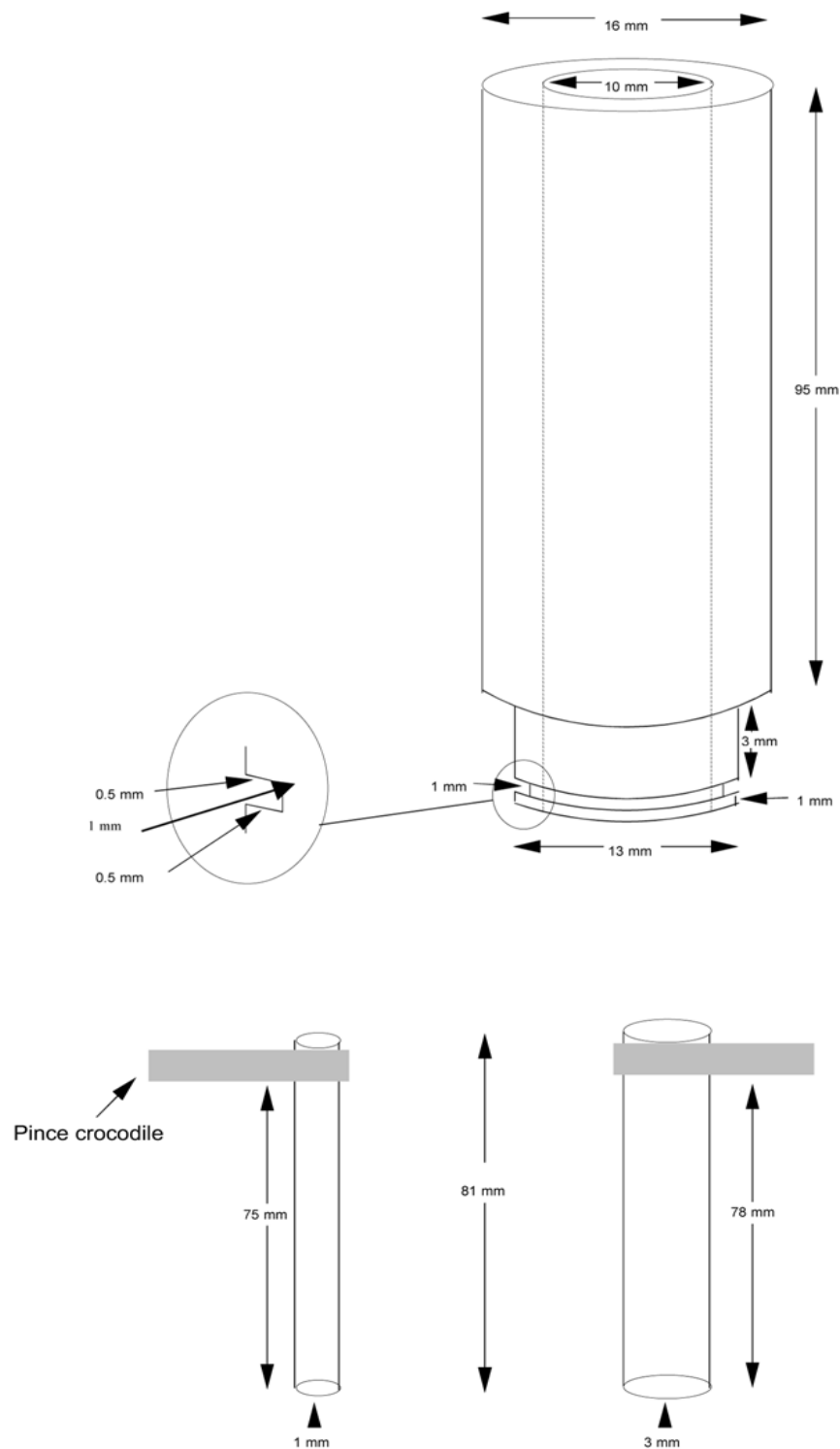


FIGURE2: DIMENSIONS DU TUBE PTFE (POLYTETRAFLUOROETHYLENE), DES TUBES RECEVEURS ET DES ELECTRODES UTILISES



Facteurs importants pour l'appareil ci-dessus:

- diamètre intérieur du tube PTFE;

- longueur des électrodes par rapport au tube PTFE et au tube receveur: le disque cutané ne doit pas être en contact avec les électrodes, et une longueur standard d'électrode doit être en contact avec la solution de sulfate de magnésium;
- quantité de solution de sulfate de magnésium dans le tube receveur: la profondeur de liquide, par rapport au niveau dans le tube PTFE, doit être telle qu'indiquée dans la figure 1;
- fixation du disque cutané sur le tube PTFE: la résistance électrique doit être véritablement une mesure des propriétés de la peau.

Appendice 1

DÉFINITIONS

C: corrosif

Concordance: mesure de performance pour les méthodes d'essai produisant des résultats catégoriels. Elle constitue un des aspects de la pertinence. Ce terme est parfois utilisé indifféremment à la place de « précision », et se définit comme la proportion de tous les produits chimiques d'essai qui ont été correctement classés comme positifs ou négatifs. La concordance dépend étroitement de la prévalence des résultats positifs dans les types de produits chimiques d'essai (20).

Contrôle positif: réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, et traité avec une substance induisant notoirement une réponse positive. Pour qu'il soit possible d'évaluer la variabilité dans le temps de la réponse du contrôle positif, l'intensité maximale de celle-ci ne doit pas être excessive.

Corrosion cutanée *in vivo*: survenue de lésions irréversibles de la peau. En l'occurrence, il s'agit de nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'un produit chimique d'essai pendant une durée allant jusqu'à quatre heures. Les réactions corrosives se traduisent généralement par des ulcères, des saignements, des croûtes sanguinolentes et, à la fin de la période d'observation, soit à 14 jours, par une décoloration due au blanchissement de la peau, des zones complètes d'alopécie, et des cicatrices. Un examen histopathologique peut être envisagé pour évaluer les lésions sujettes à questionnement.

DO: densité optique

Expérience: consiste à tester un même produit chimique en parallèle sur au minimum trois réplicats de disques cutanés.

Fiabilité: mesure dans laquelle 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 en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires (20).

IATA: Approches Intégrées pour les Essais et l'Évaluation (*Integrated Approaches to Testing and Assessment* en anglais)

Mélange: mélange ou solution composé d'au moins deux substances.

NC: non corrosif

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: (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et (iii) les niveaux de fiabilité et de précision similaires à ceux obtenus avec 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.

Pertinence: description de la relation entre la méthode d'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. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (20).

Précision: 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. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (20).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode.

Résistance électrique transcutanée (RET): mesure de l'impédance électrique de la peau, exprimée par une valeur de résistance en kilo-Ohms. Il s'agit d'une méthode simple et fiable permettant d'évaluer la fonction de barrière de la peau, par l'enregistrement du passage des ions à travers la peau à l'aide d'un pont de mesure de Wheatstone.

Sensibilité: proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (20).

SGH de l'ONU [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Spécificité: proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (20).

Substance: 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, à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans affecter sa stabilité ni modifier sa composition.

Substance mono-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle le constituant principal est présent à hauteur de 80% au moins (m/v).

Substance multi-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant figure à une concentration supérieure ou égale à 10% (m/v) and inférieure ou égale à 80% (m/v). Une substance multi-constituant est le résultat d'un processus de manufacture. La différence entre un mélange et une substance multi-constituant est que le mélange est obtenu en mélangeant deux substances ou plus sans que celles-ci réagissent entre elles. Une substance multi-constituant est le résultat d'une réaction chimique.

UVCB: substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes et matières biologiques.»

(6) Dans la partie B, le chapitre B.40 *bis* est remplacé par le texte suivant:

«B.40 *bis* CORROSION CUTANÉE IN VITRO: ESSAI SUR MODÈLE DE PEAU HUMAINE (RhE)

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 431 (2016) de l'OCDE. La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions irréversibles de la peau, qui se manifestent par une nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'un produit chimique d'essai [selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) et du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (ci-après le «règlement CLP»)¹] (1). La présente version mise à jour de la méthode d'essai B.40 *bis* propose une procédure *in vitro* permettant d'identifier les substances et mélanges corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU et du règlement CLP. Elle permet aussi une sous-catégorisation partielle des produits chimiques corrosifs.
2. Traditionnellement, l'évaluation du potentiel de corrosion cutanée par les produits chimiques a impliqué le recours à des animaux de laboratoire (méthode d'essai B.4, équivalente à la ligne directrice 404 de l'OCDE, initialement adoptée en 1981 et révisée en 1992, 2002 et 2015) (2). Outre la présente méthode d'essai B.40 *bis*, deux autres méthodes d'essai *in vitro* ont été validées et adoptées pour évaluer le potentiel de corrosion cutanée des produits chimiques, à savoir la méthode d'essai B.40 (équivalente à la ligne directrice 430 de l'OCDE) (3) et la méthode d'essai B.65 (équivalente à la méthode d'essai 435 de l'OCDE) (4). Par ailleurs, la méthode d'essai *in vitro* B.46 (équivalente à la ligne directrice 439 de l'OCDE) (5) a été adoptée pour le volet «irritation cutanée». Un document guide de l'OCDE sur les Approches Intégrées en matière d'Essai et d'Évaluation (IATA en anglais) pour l'irritation et la corrosion de la peau propose une approche modulaire pour les tests d'irritation et de corrosion de la peau. L'approche intégrée décrit plusieurs modules qui regroupent les sources d'information et les outils d'analyse, et fournit des guides sur la façon 1) d'intégrer et d'utiliser les informations existantes sur les données d'essai et autres données pour l'évaluation du potentiel irritant et corrosif pour la peau des produits chimiques d'essai, et 2) propose une approche dans les cas où des tests supplémentaires sont recommandés (6).

¹ Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) no 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

3. La présente méthode d'essai porte sur le danger de corrosion cutanée pour la santé humaine. Elle fait appel à un épiderme humain reconstitué (obtenu à partir de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain) qui reproduit fidèlement les propriétés histologiques, morphologiques, biochimiques et physiologiques des couches supérieures de la peau humaine, c'est-à-dire de l'épiderme. La ligne directrice équivalente de l'OCDE, initialement adoptée en 2004, avait été mise à jour en 2013 pour y inclure deux méthodes d'essai supplémentaires utilisant les modèles d'épiderme humain reconstitué, et la possibilité d'utiliser les méthodes pour faciliter la sous-catégorisation des produits chimiques corrosifs. La ligne directrice a de nouveau été mise à jour en 2015 pour y introduire la référence au Document guide IATA et une procédure alternative pour mesurer la viabilité cellulaire.
4. La présente méthode d'essai utilise quatre modèles d'épiderme humain reconstitué disponibles dans le commerce. Des études de prévalidation (7), suivies d'une étude formelle de validation pour l'évaluation de la corrosion cutanée (8) (9) (10), ont été menées (11)(12) sur deux de ces modèles d'essai disponibles dans le commerce, le modèle standard (SM) EpiSkin™ et l'essai de corrosion cutanée (SCT) EpiDerm™ (EPI-200) (désignées comme les méthodes de référence validées – MRV- dans le texte qui suit). Sur la base des résultats de ces études, il est désormais recommandé que ces deux MRV puissent servir, à des fins réglementaires, à distinguer les produits chimiques corrosifs (C) des produits chimiques non corrosifs (NC), et que la méthode EpiSkin™ puisse également être utilisée pour sous-catégoriser les produits chimiques corrosifs (13) (14) (15). Deux autres modèles d'essai d'irritation cutanée *in vitro* sur épiderme humain reconstitué, également disponibles dans le commerce, ont donné des résultats analogues à la MRV EpiDerm™ selon une validation fondée sur les normes de performance (16) (17) (18). Il s'agit des méthodes SkinEthic™ RHE¹ et epiCS® (précédemment connue sous le nom EST-1000), qui peuvent aussi servir à des fins réglementaires pour distinguer les produits chimiques corrosifs des produits chimiques non corrosifs (19) (20). Des études post-validation réalisées entre 2012 et 2014 par les producteurs des modèles d'épiderme humain reconstitué, à l'aide d'un protocole affiné corrigeant les interférences causées par la réduction non spécifique du MTT par les produits chimiques d'essai, ont amélioré les performances, s'agissant aussi bien de la distinction entre produits chimiques corrosifs et non corrosifs que pour soutenir la sous-catégorisation des produits chimiques corrosifs (21)(22). Des analyses statistiques sur des données collectées après la validation et générées sur EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE et epiCS® ont permis d'identifier des modèles de prédiction alternatifs qui améliorent leur capacité de prédiction pour la sous-catégorisation (23).

¹ L'abréviation RhE (= Reconstructed human Epidermis) est utilisée pour tous les modèles basés sur la technologie RhE. L'abréviation RHE utilisée conjointement avec le modèle SkinEthic™ signifie la même chose, mais faisant partie intégrante du nom de cette méthode telle que commercialisée, s'épelle en lettre capitales.

5. Avant de pouvoir utiliser à des fins réglementaires une méthode d'essai *in vitro* de corrosivité cutanée sur épiderme humain reconstitué similaire ou modifiée autre que les MRV, il convient d'en déterminer la fiabilité, la pertinence (précision) et les limitations pour l'usage préconisé, afin de s'assurer de sa similitude avec les MRV, conformément aux normes de performance (24) établies suivant les principes du document guide de l'OCDE sur la validation N° 34 (25). L'acceptation mutuelle des données n'est garantie que dans la mesure où les méthodes d'essai nouvelles ou mises à jour conformément aux normes de performances ont été examinées et intégrées dans la ligne directrice d'essai correspondante. Les modèles d'essai inclus dans cette ligne directrice peuvent être utilisés pour répondre aux exigences des pays en matière d'essais *in vitro* de corrosion cutanée, tout en bénéficiant de l'acceptation mutuelle des données.

DÉFINITIONS

6. Les définitions utilisées figurent à l'appendice 1.

CONSIDÉRATIONS INITIALES

7. La présente méthode d'essai permet d'identifier les substances et mélanges corrosifs et non corrosifs selon la définition du SGH de l'ONU et du règlement CLP. Cette méthode d'essai autorise en outre à sous-catégoriser les substances et mélanges corrosifs, en les classant dans la sous-catégorie facultative 1A telle que définie par le SGH de l'ONU (1), ou dans les sous-catégories 1B et 1C combinées (21)(22)(23). Une limite de cette méthode d'essai est qu'elle ne permet pas d'établir de distinction entre les sous-catégories de corrosivité cutanée 1B et 1C du SGH de l'ONU et du CLP, en raison du nombre limité de produits chimiques corrosifs *in vivo* de sous-catégorie 1C bien connus. Les modèles d'essai EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ et epiCS® sont à même de permettre une sous-catégorisation (1A vs 1B et 1C vs substances non corrosives (NC)).
8. Un large éventail de produits chimiques, constitué principalement de substances individuelles, a été testé durant l'étude de validation des modèles d'essai proposés dans cette méthode d'essai pour une utilisation à des fins d'identification des substances corrosives et non corrosives; la base de données empiriques de l'étude de validation totalisait 60 produits chimiques couvrant une grande variété de classes chimiques (8) (9) (10). Les tests visant à démontrer la sensibilité, la spécificité, la précision et la reproductibilité intra-laboratoire de l'essai de sous-catégorisation ont été réalisés par les développeurs de chaque méthode d'essai et leurs résultats ont été examinés par l'OCDE (21) (22) (23). D'après l'ensemble des données disponibles, la méthode d'essai peut être utilisée pour tester un large éventail de classes chimiques et d'états physiques, notamment des liquides, des semi-solides, des solides et des cires. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Si possible, les solides sont moulus finement avant application; aucun autre traitement préalable de l'échantillon n'est nécessaire. Dans les cas où l'on peut apporter la preuve que les modèles d'essai de la présente méthode d'essai ne peuvent s'appliquer à une catégorie donnée de

substances, il convient de ne pas les utiliser pour tester la catégorie de substances en question. De plus, outre les substances, cette méthode d'essai directrice est censée pouvoir s'appliquer aux mélanges. Or, les mélanges couvrant un large éventail de catégories et de compositions, et compte tenu des informations limitées disponibles actuellement à propos des essais de mélanges, dans les cas où l'on peut apporter la preuve que cette méthode d'essai ne peut s'appliquer à une catégorie donnée de mélanges (par exemple selon la stratégie proposée dans (26)), la méthode d'essai ne doit pas être utilisée pour tester la catégorie de mélanges en question. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'études de validation (8) (9) (10). Avant d'utiliser la présente méthode d'essai pour tester un mélange afin de générer des données dans un but réglementaire, il convient de s'assurer et de justifier le cas échéant, que les données générées seront adéquates. De telles dispositions ne sont pas nécessaires quand il existe une exigence réglementaire de tester le mélange. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'études de validation (9) (10). Bien qu'il soit envisageable de tester des gaz et des aérosols en faisant appel à de l'épiderme humain reconstitué, l'actuelle méthode d'essai ne permet pas de tester les produits de ce type.

9. Les produits chimiques d'essais absorbant la lumière dans la même gamme que le MTT formazan et les produits chimiques d'essais capables de réduire de façon directe le colorant vital MTT (en MTT formazan) peuvent interférer avec les mesures de viabilité cellulaire et nécessitent l'utilisation de témoins adaptés pour effectuer la correction de ces interférences. Le type de témoins adaptés qui peuvent être requis peut varier en fonction du type d'interférences produites par le produit chimique d'essai et de la procédure mise en œuvre pour mesurer le MTT formazan (voir paragraphes 25-31).
10. Si la présente méthode d'essai ne fournit pas d'informations appropriées sur l'irritation cutanée, on notera cependant que la méthode d'essai B.46 porte spécifiquement sur les essais d'irritation cutanée *in vitro* et, bien que faisant appel à un protocole différent, est basée sur le même système d'essai sur épiderme humain reconstitué (5). Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux après une exposition unique, il est recommandé de consulter le document guide de l'OCDE sur les Approches Intégrées pour les Essais et l'Evaluation (*IATA* en anglais) (6). Cette approche IATA prévoit la conduite d'essais *in vitro* de corrosion cutanée (tels que décrits dans la présente méthode d'essai) et d'irritation cutanée avant d'envisager des essais sur des animaux vivants. Il est entendu que l'utilisation de peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique nationales et internationales.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Le produit chimique d'essai est appliqué localement sur un modèle tridimensionnel d'épiderme humain reconstitué, composé de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain et mis en culture pour former un modèle multicouche hautement différencié d'épiderme humain. Ce modèle se compose de couches organisées (basale, épineuse et granuleuse), ainsi que d'un

stratum corneum multicouche contenant des couches lipidiques lamellaires intercellulaires représentant les principales classes de lipides, semblables à celles que l'on observe *in vivo*.

12. La méthode d'essai sur épiderme humain reconstitué part du principe que les substances corrosives sont capables de pénétrer dans le *stratum corneum* (couche cornée) par diffusion ou érosion, et sont cytotoxiques pour les cellules des couches sous-jacentes. La viabilité cellulaire est mesurée via la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de tétrazolium; numéro CAS 298-93-1] en un sel de formazan bleu mesuré quantitativement après son extraction des tissus (27). Les substances corrosives sont mises en évidence par leur capacité à faire chuter la viabilité cellulaire sous un seuil prédéterminé (voir paragraphes 31 et 32). Dans la pratique, la méthode d'essai de corrosion cutanée sur épiderme humain reconstitué s'est révélée fiable pour prédire la corrosion cutanée *in vivo* sur le lapin selon la méthode d'essai B.4 (2).

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

13. Avant d'appliquer en routine l'un des quatre modèles validés d'essai sur épiderme humain reconstitué conformément à la présente méthode d'essai, les laboratoires doivent faire la preuve de leur compétence technique en classifiant correctement les douze produits énumérés au tableau 1. S'ils utilisent une méthode de sous-classification, l'exactitude de la sous-catégorisation doit également être démontrée. Dans le cas où une substance figurant dans le tableau 1 serait indisponible, ou dans d'autres cas où il est justifié de la remplacer par une autre substance (par exemple à partir de la liste de substances de référence (24)), cette autre substance peut être utilisée si des données de référence appropriées *in vivo* et *in vitro* sont disponibles, et dans la mesure où les mêmes critères de sélection que ceux décrits sous le tableau 1 sont utilisés.

Tableau 1: Liste des Substances d'épreuve de compétence ¹

Substance ¹	Numéro CAS	Classe chimique ²	Cat. SGH de l'ONU/CL P d'après les résultats <i>in vivo</i> ³	Cat MVR d'après les résultats <i>in vitro</i> ⁴	Agent réducteur du MTT ⁵	État physique
Substances corrosives <i>in vivo</i> de sous-catégorie 1A						
Acide bromoacétique	79-08-3	acide organique	1A	(3) 1A	--	S.
Trifluorure de bore dihydraté	13319-75-0	acide inorganique	1A	(3) 1A	--	L.
Phénol	108-95-2	phénol	1A	(3) 1A	--	S.
Chlorure de dichloroacétyle	79-36-7	électrophile	1A	(3) 1A	--	L.
Combinaison de substances corrosives <i>in vivo</i> de sous-catégorie 1B-et-1C						
Acide glyoxylique monohydraté	563-96-2	acide organique	1B-et-1C	(3) 1B-et-1C	--	S.

Acide lactique	598-82-3	acide organique	1B-et-1C	(3) 1B-et-1C	--	L
Ethanolamine	141-43-5	base organique	1B	(3) 1B-et-1C	O	V.
Acide chlorhydrique	7647-01-0	acide inorganique	1B-et-1C	(3) 1B-et-1C	--	L.
Substances non corrosives <i>in vivo</i>						
Bromure de phénétyle	103-63-9	électrophile	NC	(3) NC	O	L
4-amino-1,2,4-triazole	584-13-4	base organique	NC	(3) NC	—	S.
4-(méthylthio)-benzaldéhyde	3446-89-7	électrophile	NC	(3) NC	O	L
Acide laurique	143-07-7	acide organique	NC	(3) NC	—	S.

Abréviations: CAS = numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service; MRV = méthode de référence validée; NC= non corrosif.

¹ Les substances d'épreuve de compétence d'abord classées en substances corrosives et non corrosives, puis par sous-catégorie de substances corrosives, puis par classe chimique, ont été choisies parmi les substances utilisées dans les études de validation d'EpiSkin™ et d'EpiDerm™ du CEVMA (8) (9) (10) et dans les études post-validation s'appuyant sur les données fournies par les développeurs de EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ et epiCS®. Sauf indication contraire, les substances ont été testées au niveau de pureté qui était le leur lors de l'achat auprès de la source commerciale (8) (10). Cette sélection inclut, dans la mesure du possible, des substances qui: (i) sont représentatives de la gamme des réactions de corrosion provoquées (par exemple non corrosives; faiblement à fortement corrosives) que les MRV sont capables de mesurer ou de prévoir; (ii) sont représentatives des classes chimiques utilisées dans les études de validation; (iii) ont une structure chimique bien définie; (iv) permettent d'obtenir des résultats reproductibles avec la MRV; (v) permettent d'obtenir des résultats définitifs avec la méthode d'essai *in vivo* de référence; (vi) sont disponibles dans le commerce et (vii) ne sont pas associées à des coûts d'élimination prohibitifs.

² Classe chimique assignée par Barratt et al. (8).

³ Les groupes d'emballage de l'ONU correspondants sont les groupes I, II et III respectivement pour les catégories 1A, 1B et 1C du SGH de l'ONU/CLP.

⁴ Les prédictions *in vitro* de la MRV consignées dans le tableau ont été obtenues avec les modèles d'essai EpiSkin™ et EpiDerm™ (MRV) au cours d'essais ultérieurs post-validation réalisés par les développeurs de la méthode d'essai.

⁵ Les valeurs de viabilité obtenues dans l'étude de validation pour la corrosion de la peau du CEVMA n'ont pas été corrigées pour la réduction MTT directe (aucun témoins sur tissus morts n'a été réalisé lors de l'étude de validation). Cependant, les données post-validation obtenues par le développeur de la méthode d'essai qui sont présentées dans ce tableau ont été obtenues avec des témoins adaptés (23).

14. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé à l'utilisateur de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Cette étape est particulièrement importante lorsque les tissus sont transportés sur de longues distances/durées. Lorsqu'une méthode d'essai a été établie avec succès, et que le laboratoire a démontré sa maîtrise de cette méthode, il ne sera plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification. Toutefois, pour les méthodes d'essai utilisées en routine, il est recommandé de continuer à évaluer les propriétés de barrière des tissus à intervalles réguliers.

PROCÉDURE

15. Les paragraphes qui suivent offrent une description générique des éléments et des procédures des modèles d'essai de corrosion cutanée sur épiderme humain reconstitué utilisés dans la présente méthode d'essai. Les modèles d'épiderme humain reconstitué considérés comme scientifiquement valides à utiliser dans cette méthode d'essai, à savoir les modèles EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE et epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), sont disponibles dans le commerce. Il existe des modes opératoires normalisés pour ces quatre modèles d'épiderme humain reconstitué (34) (35) (36), et les principaux éléments de leur méthode d'essai sont résumés à l'appendice 2. Il est recommandé de consulter le mode opératoire normalisé pertinent lors de la mise en œuvre et de l'utilisation d'un de ces modèles en laboratoire. Les essais réalisés avec les quatre modèles d'essai sur épiderme humain reconstitué prévus par la méthode d'essai doivent respecter les éléments suivants:

ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

Conditions générales

16. L'épithélium est reconstruit à partir de kératinocytes humains non transformés. Plusieurs couches de cellules épithéliales viables (couche basale, stratum spinosum, stratum granulosum) doivent être présentes sous un stratum corneum fonctionnel. Le stratum corneum doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide des substances marqueurs cytotoxiques telles que le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou le Triton X-100. La fonction de barrière doit être démontrée et peut être évaluée soit en déterminant la concentration à laquelle une substance marqueur réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI50) après un temps d'exposition donné, soit en définissant le temps d'exposition requis pour réduire la viabilité des cellules de 50 % (TE50) après application de la substance marqueur à une concentration fixe déterminée (voir paragraphe 18). Le modèle d'épiderme humain reconstitué doit présenter des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que de la matière puisse contourner le stratum corneum pour atteindre les tissus viables, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition cutanée. Enfin, le modèle doit être exempt de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmaïque ou mycosique.

Conditions fonctionnelles

Viabilité

17. La quantification de la viabilité cellulaire est mesurée au moyen du colorant MTT (27). Les cellules viables du modèle d'épiderme humain reconstitué réduisent le colorant vital MTT en un précipité bleu de sel de formazan., qui est ensuite extrait des tissus au moyen de l'isopropanol (ou d'un solvant similaire). La densité optique du solvant d'extraction seul doit être suffisamment faible, c'est-à-dire inférieure à 0,1. Le MTT formazan extrait peut être quantifié soit en mesurant l'absorbance standard (DO), ou une procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC (38). Les utilisateurs du modèle d'épiderme humain reconstitué doivent faire en sorte que chaque lot utilisé réponde aux critères définis pour le témoin négatif. Une plage

d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour le témoin négatif doit être établie par le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité des valeurs de densité optique pour les témoins négatifs des quatre modèles d'essai sur épiderme humain reconstitué validés figurant dans cette méthode d'essai sont indiquées dans le tableau 2. L'utilisateur de spectrophotométrie HPLC-UPLC devra utiliser la plage de densité optique des témoins négatifs fournie au tableau 2 comme critère d'acceptabilité du témoin négatif. Il est démontré que les tissus traités par le témoin négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de DO similaires) tout au long de la période d'exposition.

Tableau 2 : Plages d'acceptabilité des valeurs de DO du témoin négatif pour contrôler la qualité du lot.

	Valeur limite inférieure	Valeur limite supérieure
EpiSkin™ (SM)	> 0,6	<< 1,5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	> 0,8	< 2,8
SkinEthic™ RHE	> 0,8	< 3,0
epiCS®	> 0,8	< 2,8

Fonction de barrière

18. Le *stratum corneum* et sa composition lipidique doivent être suffisants pour résister à la pénétration rapide de certains produits chimiques marqueurs cytotoxiques tels que le SDS ou le Triton X-100, cette capacité étant évaluée par la CI_{50} et le TE_{50} (voir tableau 3). La fonction de barrière de chaque lot de modèle de peau reconstituée doit être démontrée par le développeur/fournisseur au moment de la fourniture des tissus à l'utilisateur final (voir paragraphe 21).

Morphologie

19. L'examen histologique du modèle d'épiderme humain reconstitué doit mettre en évidence une structure multicouche semblable à celle de l'épiderme humain (comprenant un *stratum basale*, un *stratum spinosum*, un *stratum granulosum* et un *stratum corneum*) ainsi qu'un profil lipidique semblable à celui de l'épiderme humain. L'examen histologique de chaque lot de modèle de peau reconstituée utilisé, démontrant une morphologie adéquate des tissus, doit être fourni par le développeur/fournisseur au moment de la livraison des tissus à l'utilisateur final (voir paragraphe 21).

Reproductibilité

20. Les utilisateurs des méthodes d'essai doivent démontrer la reproductibilité dans le temps des résultats obtenus à l'aide des témoins positifs et négatifs. De plus, il ne faut utiliser la méthode d'essai que si le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué fournit des données démontrant sa reproductibilité dans le temps à l'aide de produits chimiques corrosifs et non corrosifs figurant par exemple sur la liste des produits chimiques d'épreuve (tableau 1). Si

l'on utilise une méthode d'essai à des fins de sous-catégorisation, il convient de démontrer aussi la reproductibilité de cette sous-classification.

Contrôle de qualité

21. Le modèle d'épiderme humain reconstitué ne doit être utilisé que si le développeur/fournisseur démontre que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la *viabilité* (paragraphe 17), à la *fonction de barrière* (paragraphe 18) et à la *morphologie* (paragraphe 19). Ces informations sont communiquées aux utilisateurs afin qu'ils puissent les inclure dans le rapport d'essai. Seuls les résultats obtenus à l'aide de lots de tissus ayant subi avec succès le contrôle de qualité pourront être retenus pour prédire de façon fiable la classification de la corrosivité. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs CI_{50} ou TE_{50} est établie par le développeur/fournisseur d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité pour les quatre modèles d'essai validés sont indiquées dans le tableau 3.

Table 3: Critères de contrôle de qualité des lots

	Valeur limite inférieure	Valeur limite supérieure
EpiSkin™ (SM) (18 heures de traitement par SDS) (33)	$CI_{50} = 1,0$ mg/ml	$CI_{50} = 3,0$ mg/ml
EpiDerm™ SCT (EPI-200) (Triton X-100 à 1 %)(34)	$TE_{50} = 4,0$ heures	$TE_{50} = 8,7$ heures
SkinEthic™ RHE (Triton X-100 à 1 %)(35)	$TE_{50} = 4,0$ heures	$TE_{50} = 10,0$ heures
epiCS® (Triton X-100 à 1 %)(36)	$TE_{50} = 2,0$ heures	$TE_{50} = 7,0$ heures

Application des produits chimiques d'essai et des produits chimiques témoins

22. Il convient d'utiliser au minimum deux réplicats de tissus par période d'exposition pour chaque produit chimique d'essai et substance témoin. Pour les produits chimiques liquides comme pour les produits chimiques solides, il convient d'appliquer une quantité suffisante de produit chimique pour recouvrir uniformément la surface de la peau, sans pour autant utiliser une dose infinie, c'est-à-dire au minimum $70 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ou $30 \text{ mg}/\text{cm}^2$. Selon les modèles, il convient d'humidifier la surface de l'épiderme avec de l'eau déionisée ou distillée avant application de produits chimiques solides, afin d'assurer un bon contact entre le produit chimique et la surface de l'épiderme (34) (35) (36) (37). Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. La méthode d'application doit convenir au produit chimique d'essai (voir par exemple les références 34 à 37). À la fin de la période d'exposition, l'épiderme doit être nettoyé avec soin à l'aide d'un tampon aqueux ou de NaCl à 0,9 %. En fonction du

modèle validé utilisé, deux ou trois périodes d'exposition sont nécessaires par produit chimique d'essai (pour les quatre modèles validés d'épiderme humain reconstitué: 3 min et 1 heure; pour EpiSkin™, une période d'exposition supplémentaire de 4 heures). Selon le modèle d'essai utilisé et la période d'exposition évaluée, la température d'incubation peut varier entre la température ambiante et 37°C.

23. Des témoins négatifs et positifs sont utilisés simultanément pour chaque épreuve afin de démontrer que la viabilité (dans le cas des témoins négatifs), la fonction de barrière et la sensibilité cellulaire qui en résulte (dans le cas du témoin positif) se situent dans une fourchette de valeurs admissibles, définie d'après les résultats historiques. Les substances de témoin positif recommandées sont l'acide acétique glacial ou l'hydroxyde de potassium 8N en fonction du modèle d'épiderme humain reconstitué mis en œuvre. Il convient de noter que l'hydroxyde de potassium 8N est un agent réducteur direct du MTT, qui peut nécessiter l'utilisation de témoins adaptés décrits aux paragraphes 25 et 26. Les témoins négatifs recommandés sont une solution NaCl à 0.9 % (p/v) ou de l'eau.

Mesures de la viabilité cellulaire

24. Il convient de recourir au test MTT, qui est un essai quantitatif, pour mesurer la viabilité cellulaire dans le cadre de cette méthode d'essai (27). L'échantillon de tissu est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (0,3 ou 1 mg/ml) pendant 3 heures. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (par exemple isopropanol, isopropanol acide), et l'on mesure la concentration du formazan en déterminant sa DO à 570 nm à l'aide d'un filtre passe-bande de ± 30 nm au maximum, ou par une procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC (voir paragraphes 30 et 31) (38).
25. Les produits chimiques d'essai sont susceptibles d'interférer avec le test MTT, par réduction directe du MTT en formazan bleu, et/ou par interférence de couleurs si le produit chimique d'essai absorbe, naturellement ou sous l'effet des procédures du traitement, dans la même plage de densité optique que le formazan (570 ± 30 nm, produits chimiques principalement bleus et violets). Des contrôles ou témoins supplémentaires doivent être utilisés pour détecter et corriger les interférences potentielles avec ces produits chimiques d'essai, tel qu'un témoin de réduction non-spécifique du MTT (MTT NS) et un témoin coloré non-spécifique (T NS) (voir paragraphes 26 à 30). Cela est particulièrement important lorsque le produit chimique d'essai n'a pas été totalement éliminé du tissu par rinçage ou lorsqu'il a pénétré dans l'épiderme, et est donc présent dans les tissus lors de l'essai de viabilité au MTT. On trouvera une description détaillée de la manière de corriger la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants dans le mode opératoire normalisé des méthodes d'essai (34) (35) (36) (37).
26. Afin d'identifier les agents réducteurs directs du MTT, il convient d'ajouter chaque produit chimique d'essai à un milieu MTT fraîchement préparé (34) (35) (36) (37). Si le mélange de MTT et de produit chimique d'essai (ou la suspension testée pour les produits chimiques d'essais insolubles) devient bleu/violet, on considère que le produit chimique d'essai est un

réducteur direct du MTT et il convient alors de procéder à des vérifications fonctionnelles supplémentaires sur les modèles d'épithélium humain reconstruit non viables, indépendamment du choix de mesurer l'absorbance (OD) ou de procéder par analyse par HPLC/UPLC-spectrophotométrie. Cette vérification s'effectue sur des tissus tués qui ne présentent qu'une activité métabolique résiduelle, mais absorbent et retiennent le produit chimique d'essai dans des proportions similaires aux tissus viables. Chaque produit chimique réducteur du MTT est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la méthode d'essai complète de corrosion de la peau. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au réducteur du MTT (%viabilité_{test}) moins le pourcentage de réduction non spécifique du MTT obtenu pour les tissus tués exposés au même réducteur du MTT et calculé en proportion du témoin négatif testé en parallèle de l'essai à corriger (%MTT NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité_{test}] - [%MTT NS].

27. Pour repérer les interférences potentielles par des produits chimiques d'essai colorés ou qui deviennent colorés en contact avec l'eau ou l'isopropanol, et pour déterminer si des témoins supplémentaires sont nécessaires, une analyse de spectre est menée sur les produits chimiques dans l'eau (environnement au moment de l'exposition) et/ou dans l'isopropanol (solvant d'extraction). Si le produit chimique d'essai dans l'eau et/ou dans l'isopropanol absorbe assez la lumière à une longueur d'onde de 570 ± 30 nm, alors on considère que le produit chimique d'essai interfère avec la mesure de l'absorbance (DO) du formazan et des témoins colorés doivent être préparés, ou bien une procédure d'analyse par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est employée et aucun témoin supplémentaire n'est nécessaire (voir paragraphes 30 et 31). Lorsque les mesures d'absorbance (DO) sont effectuées, chaque produit chimique d'essai causant une interférence est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus viables, et les deux réplicats sont soumis à la procédure d'essai complète de corrosion de la peau, à la seule différence qu'ils sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape de l'incubation avec MTT, afin de générer un témoin de couleur non spécifique dans les tissus vivants (T_{vivants} NS). Le témoin T_{vivants} NS est testé en parallèle de l'essai avec le produit chimique d'essai coloré et, dans le cas d'un essai multiple, un témoin T_{vivants} NS indépendant est effectué pour chaque essai (dans chaque épreuve) pour tenir compte de la variabilité biologique inhérente aux tissus vivants. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une interférence et incubés avec la solution MTT (%viabilité_{test}) moins le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT en parallèle de l'essai à corriger (%T_{vivants} NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité_{test}] - [%T_{vivants} NS].
28. Dans le cas des produits chimiques identifiés comme causant à la fois une réduction directe du MTT (voir paragraphe 26) et une interférence de couleurs (voir paragraphe 27), une troisième série de témoins est nécessaire lors de la mesure de l'absorbance (DO), en plus des témoins MTT NS et T_{vivants} NS décrits aux paragraphes précédents. En général, ce cas se présente pour

les produits chimiques d'essai foncés (bleus, violets, noirs, par exemple), car leur couleur intrinsèque empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT décrite au paragraphe 26. Les produits chimiques d'essai sont susceptibles d'être absorbés et retenus à la fois par les tissus vivants et par les tissus tués. Par conséquent et dans ce cas, l'utilisation du témoin MTT NS peut permettre de corriger l'essai non seulement en fonction du potentiel de réduction directe du MTT du produit chimique d'essai, mais aussi de l'interférence de couleurs due à l'absorption et la rétention du produit chimique d'essai par les tissus tués. Cela signifie qu'une double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs peut devoir être effectuée, étant donné que le témoin T_{vivants} NS permet déjà de tenir compte de l'interférence de couleurs due à l'absorption et à la rétention du produit chimique d'essai par les tissus vivants. Afin d'éviter cette double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs, un troisième témoin pour la couleur non spécifique dans les tissus tués (T_{morts} NS) doit être préparé. Dans ce témoin supplémentaire, le produit chimique d'essai est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la procédure d'essai complète mais qui sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape d'incubation avec MTT. Un seul témoin T_{morts} NS par produit chimique d'essai suffit, indépendamment du nombre d'épreuves, mais il doit être mené en parallèle du témoin NSMTT et sur le même lot de tissus. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique d'essai (%viabilité_{test}) moins %NSMTT moins % T_{vivants} NS plus le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus tués exposés au produit chimique d'essai causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT, calculé en proportion du témoin négatif mené en parallèle de l'essai à corriger (%T_{morts} NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité_{test}] - [%MTT NS] - [%T_{vivants} NS] + [%T_{morts} NS].

29. Il importe de noter qu'une réduction non spécifique du MTT et des interférences de couleurs non spécifiques peuvent porter l'absorbance (DO) de l'extrait tissulaire au-dessus de la plage de linéarité du spectrophotomètre. Il est donc important que chaque laboratoire détermine la plage de linéarité de son spectrophotomètre (pour la DO/surface de pic), par exemple à l'aide de formazan (CAS # 57360-69-7), disponible dans le commerce, avant de tester les produits chimiques à des fins réglementaires. Les mesures d'absorbance standard (DO) au moyen d'un spectrophotomètre sont pertinentes pour évaluer les réducteurs directs du MTT et les produits chimiques d'essai colorés quand la DO des extraits de tissus traités par le produit chimique d'essai sans correction pour la réduction directe du MTT et/ou pour les interférences de couleur sont dans la plage de linéarité du spectrophotomètre ou quand le pourcentage de viabilité non-corrigée obtenu avec le produit chimique d'essai le classe déjà comme corrosif (voir paragraphes 35 et 36). Néanmoins, les résultats pour les produits chimiques d'essai indiquant % MTT NS et/ou T_{vivants} NS $\geq 50\%$ du témoin négatif doivent être interprétés avec précaution.
30. Pour les produits chimiques d'essai colorés qui ne sont pas compatibles avec la mesure de l'absorbance standard (DO) à cause de leur forte interférence avec l'essai de MTT, peuvent être évalués par une procédure de HPLC/UPLC-spectrophotométrie (voir paragraphe 31) (38).

Le système HPLC/UPLC permet de séparer le formazan du produit chimique avant la quantification (38). Pour cette raison, les témoins T_{vivants} NS et T_{morts} NS ne sont pas nécessaires pour la procédure HPLC/UPLC-spectrophotométrie, quel que soit le produit chimique d'essai. Les témoins MTT NS sont néanmoins nécessaires si l'on s'attend à ce que le produit chimique d'essai soit un réducteur direct du MTT, ou que la couleur empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT (en suivant la procédure décrite au paragraphe 26). Lorsqu'une procédure par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est employée pour quantifier le formazan, la viabilité tissulaire est calculée en pourcentage par comparaison de la surface de pic de formazan obtenue avec des tissus vivants exposés au produit chimique d'essai avec la surface de pic de formazan obtenue avec le témoin négatif parallèle. Pour les produits chimiques d'essai réducteurs directs du MTT, la viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: $\% \text{viabilité}_{\text{test}} \text{ moins } \% \text{MTT NS}$. Pour finir, il convient de noter que les réducteurs directs du MTT ou les réducteurs directs du MTT causant aussi une interférence de couleurs, qui sont retenus dans les tissus après le traitement et dont la capacité de réduction du MTT est telle qu'elle conduit à des DO (pour la mesure de DO) ou à des surfaces de pic (pour la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie) des extraits tissulaires testés situées en-dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre, ne peuvent pas être évalués; ce cas ne se présente a priori que très rarement.

31. La procédure par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est utilisable pour mesurer le formazan pour tous les types de produits chimiques (colorés ou non, réducteurs ou non réducteurs du MTT) (38). Étant donné la diversité des équipements de HPLC/UPLC -spectrophotométrie, tous les utilisateurs ne pourront pas reproduire des conditions d'équipement identiques. Pour cette raison, preuve doit être faite de l'efficacité de l'équipement de HPLC/UPLC -spectrophotométrie avant que celui-ci ne soit utilisé pour quantifier le formazan des extraits tissulaires, en remplissant les critères d'acceptabilité pour un ensemble de paramètres normalisés de qualification inspirés des paramètres décrits dans les recommandations à l'industrie de la *Food and Drug Administration* des États-Unis sur la validation des méthodes de bio-analyse (38) (39). Ces paramètres fondamentaux et leurs critères d'acceptation sont fournis à l'appendice 4. Une fois que les critères d'acceptabilité définis à l'appendice 4 ont été remplis, l'équipement de HPLC/UPLC-spectrophotométrie est considéré comme ayant fait la preuve de son efficacité et prêt pour les mesures du formazan dans les conditions expérimentales décrites dans la présente méthode d'essai.

Critères d'acceptabilité

32. Pour chaque méthode d'essai recourant à des modèles d'épiderme humain reconstitué valides, les tissus traités par le témoin négatif présentent une DO rendant compte de la qualité des tissus qui respecte les plages d'acceptabilité du tableau 2 et qui ne doit pas être inférieure aux limites historiques. Les résultats obtenus pour les tissus traités par le témoin positif, c'est-à-dire l'acide acétique glacial ou l'hydroxyde de potassium 8N, doivent montrer leur capacité à réagir à un produit chimique corrosif dans les conditions du modèle d'essai (voir appendice 2). La variabilité entre les répliquats de tissus pour les produits chimiques d'essai et/ou les produits chimiques témoins doit se situer dans la plage acceptable pour chaque modèle validé

d'épiderme humain reconstitué (voir appendice 2) (par exemple la différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 30 %). Si le témoin négatif ou positif inclus dans une épreuve sort de la plage d'acceptabilité, l'épreuve est considérée comme non qualifiée et doit être répétée. Si la variabilité des produits chimiques d'essai sort de la plage des valeurs admissibles, l'essai doit être répété.

Interprétation des résultats et modèle prédictif

33. Les valeurs de DO obtenues pour chaque produit chimique d'essai doivent servir à calculer un pourcentage de viabilité par rapport au témoin négatif, dont la DO est fixée à 100 %. Dans le cas où la spectrophotométrie HPLC-UPLC est utilisée, le pourcentage de viabilité cellulaire est obtenu en calculant le pourcentage de MTT formazan au pic obtenu avec les tissus vivants traités par le produit chimique d'essai par rapport au pic de MTT formazan obtenu avec le témoin négatif testé en parallèle. Les valeurs seuils du pourcentage de viabilité cellulaire qui établissent la distinction entre les matières corrosives et les matières non corrosives (ou entre les différentes sous-catégories de substances corrosives) sont définies ci-dessous aux paragraphes 35 et 36 pour chacun des modèles d'essai inclus dans la présente méthode d'essai et doivent être utilisées pour interpréter les résultats.
34. Une seule expérience réalisée à l'aide d'au moins deux réplicats de tissus devrait suffire pour tester un produit chimique dont la classification obtenue est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents réplicats, une deuxième épreuve peut être envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.
35. Le tableau 4 présente le modèle prédictif de la méthode d'essai de corrosion cutanée EpiSkin™ (9) (22) (34), en correspondance avec le système de classification du SGH de l'ONU/du règlement CLP:

Table 4: Modèle prédictif d'EpiSkin™

Viabilité mesurée après différents temps d'exposition (t = 3, 60 et 240 minutes)	Prévision à considérer
< 35 % après 3 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif: • Sous-catégorie facultative 1A *
≥ 35 % après 3 minutes d'exposition ET < 35 % après 60 minutes d'exposition OU ≥ 35 % après 60 minutes d'exposition ET < 35 % après 240 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif: Combinaison des sous-catégories facultatives 1B et 1C
≥ 35 % après 240 minutes d'exposition	Produit chimique non-corrosif

*) D'après les données produites pour évaluer l'utilité des modèles d'essai sur épiderme humain reconstitué à des fins de sous-catégorisation, environ 22 % des résultats du modèle d'essai EpiSkin™ relevant de la sous-

catégorie 1A pourraient en fait constituer des substances/mélanges de sous-catégories 1B ou 1C (surclassification) (voir appendice 3).

36. Le tableau 5 présente les modèles prédictifs des modèles d'essai de corrosion cutanée EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36) et epiCS® (16) (23) (37), en correspondance avec le système de classification du SGH de l'ONU/du règlement CLP:

Tableau 5: EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE et epiCS®

Viabilité mesurée après différents temps d'exposition (t = 3 et 60	Prévision à considérer
ÉTAPE 1 pour EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE et epiCS®	
< 50 % après 3 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif
≥ 50 % après 3 minutes d'exposition ET < 15 % après 60 minutes d'exposition	Produit chimique corrosif
≥ 50 % après 3 minutes d'exposition ET ≥ 15 % après 60 minutes d'exposition	Produit chimique non corrosif
ÉTAPE 2 pour EpiDerm™ SCT- pour les substances et mélanges identifiés comme corrosifs à l'étape 1	
< 25 % après 3 minutes d'exposition	Sous-catégorie optionnelle 1A*
≥ 25 % après 3 minutes d'exposition	Une combinaison des sous-catégories 1B-et-1C
ÉTAPE 2 pour SkinEthic™ RHE pour les substances et mélanges identifiés comme corrosifs à l'étape 1	
< 18 % après 3 minutes d'exposition	Sous-catégorie optionnelle 1A*
≥ 18 % après 3 minutes d'exposition	Une combinaison des sous-catégories 1B-et-1C
ÉTAPE 2 pour epiCS® pour les substances et mélanges identifiés comme corrosifs à l'étape 1	
< 15 % après 3 minutes d'exposition	Sous-catégorie optionnelle 1A*
≥ 15 % après 3 minutes d'exposition	Une combinaison des sous-catégories 1B-et-1C

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

37. Pour chaque essai, il convient de présenter, sous forme de tableau, les résultats obtenus pour chaque réplicat de tissu (par exemple les valeurs de DO et le pourcentage de viabilité cellulaire calculé pour chaque produit chimique d'essai, ainsi que la classification correspondante), y compris les données obtenues, le cas échéant, en répétant les expériences. En outre, les

moyennes et les fourchettes de viabilité ainsi que les coefficients de variation entre les réplicats de tissus pour chaque essai doivent être consignés. Les interactions observées avec le réactif MTT pour les réducteurs directs du MTT et les produits chimiques d'essai colorés seront signalées pour chaque produit chimique d'essai.

Rapport d'essai

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

Produits chimiques d'essai et produits chimiques témoins:

- Substance mono-constituant: Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent;
- Substance multi-constituants, UVCB ou mélange: • Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;
- Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
- Source et numéro de lot si disponible;
- Traitement du produit chimique d'essai ou du témoin avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage);
- Stabilité du produit chimique d'essai, date de péremption, ou date de vérification analytique si disponible;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Modèle d'épiderme humain reconstitué et protocole utilisés; justification de ce choix (le cas échéant)

Conditions de l'essai:

- modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé (y compris numéro de lot);
- informations d'étalonnage de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre), longueur d'onde et passe-bande (s'il y a lieu) utilisés pour quantifier le MTT formazan, et la plage de linéarité de cet appareil de mesure;
- description de la méthode utilisée pour quantifier le MTT formazan;
- description des spécifications du système de spectrophotométrie HPLC/UPLC, s'il y a lieu;
- informations complètes sur le modèle spécifique d'épiderme humain reconstitué utilisé, et notamment sur ses performances, à savoir (liste non limitative):
 - i) Viabilité;
 - ii) Fonction de barrière;

- iii) Morphologie;
- iv) Reproductibilité et capacité prédictive;
- v) contrôles de qualité (CQ) du modèle;

- références des données historiques du modèle utilisé, à savoir (liste non limitative)
- l'acceptabilité des données de contrôle de qualité faisant référence aux données historiques du lot;
- démonstration de la compétence à exécuter la méthode d'essai, avant une utilisation régulière, au moyen des substances d'épreuve de compétence.

Protocole de l'essai:

- description détaillée des procédures appliquées, y compris les procédures de lavage utilisées après la période d'exposition;
- doses de produit chimique d'essai et de produit chimique témoin;
- durée de la ou des périodes d'exposition et température(s) d'exposition;
- indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques colorés, s'il y a lieu;
- nombre de réplicats de tissus utilisés par produit chimique d'essai et témoin (contrôle positif, témoin négatif et, le cas échéant, réduction non spécifique du MTT et coloration non spécifique, témoin vivant non spécifique ($T_{\text{vivant}} \text{ NS}$), témoin mort non spécifique ($T_{\text{mort}} \text{ NS}$)), par temps d'exposition;
- description des critères de décision/du modèle prédictif appliqués en fonction du modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé;
- description de toute modification apportée au protocole d'essai (y compris aux procédures de lavage).

Critères d'acceptabilité de l'épreuve et de l'essai:

- valeur moyenne des témoins positifs et négatifs et plage d'acceptabilité par rapports aux données historiques;
- variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour les témoins positifs et négatifs;
- variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour le produit chimique d'essai.

Résultats:

- présentation des résultats sous forme de tableau, pour chaque produit chimique d'essai et substance de témoin, chaque période d'exposition, chaque épreuve et chaque mesure de réplicat, y compris la densité optique ou le pic de MTT formazan, le pourcentage de viabilité cellulaire, le pourcentage moyen de viabilité cellulaire, les différences entre les réplicats, l'erreur standard et/ou le coefficient de variation s'il y a lieu;
- S'il y a lieu, les résultats des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques d'essai colorants, y compris la densité optique ou le pic de MTT formazan, % MTT

NS, % Tvivant NS, %Tmort NS, les différences entre les réplicats de tissus, l'erreur standard et/ou le coefficient de variation s'il y a lieu, et le pourcentage final corrigé de viabilité cellulaire;

- Résultats obtenus pour le ou les produits chimiques d'essai et le ou les produits chimiques témoins au regard des critères d'acceptabilité de l'épreuve et de l'essai définis;
- description de tous autres effets observés;
- classification obtenue compte tenu du modèle prédictif/des critères de décision utilisés.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Nations Unies (ONU). (2013). Système Général Harmonisé de Classification et d'Etiquetage des Produits Chimiques (SGH) des Nations Unies, Cinquième Edition Révisée, ONU New York et Genève. Disponible à l'adresse: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html
- (2) Chapitre B.4 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur la peau.
- (3) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée *in vitro*: essai de résistance électrique transcutanée (RET).
- (4) Chapitre B.65 de la présente annexe, Méthode d'essai *in vitro* sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée.
- (5) Chapitre B.46 de la présente annexe, Irritation cutanée *in vitro*: essai sur épiderme humain reconstitué.
- (6) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (N° 203) Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponc M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop 6. *ATLA* 23:219-255.
- (8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 12:471-482.
- (9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzthutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxicol. in Vitro* 12:483-524.
- (10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzthutter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.
- (11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, *ATLA* 23:129-147.

- (12) ICCVAM. (Comité de Coordination Interagences sur la Validation des Méthodes Alternatives) (1997), Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, États-Unis..
- (13) ICCVAM (Comité de Coordination Interagences sur la Validation des Méthodes Alternatives). (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, États-Unis..
- (14) CE-CEVMA. (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC10), 3 avril 1998. .
- (15) CE-CEVMA. (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC14), 21 mars 2000..
- (16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.
- (17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.
- (18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm² Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.
- (19) CE-CEVMA. (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC25), (17 novembre 2006)..
- (20) CE-CEVMA. (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an In-Vitro Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Publié par le Comité Consultatif Scientifique du CEVMA (ESAC30), (12 juin 2009).
- (21) OCDE (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 190). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

- (22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.
- (23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.
- (24) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris
- (25) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. . Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.
- (27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
- (28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro*. In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A., Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.
- (29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.
- (30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. *Inter. J. Pharmaceu.* 203:211 - 225.
- (31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.
- (32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

- (33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8:747-756.
- (34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.
- (35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.
- (36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.
- (37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.
- (38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.
- (39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001).
 Disponible à l'adresse:
[\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf).

Appendice 1

DÉFINITIONS

Précision: 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. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (25).

Viabilité cellulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire, par exemple la capacité des déshydrogénases mitochondriales cellulaires à réduire le colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium], qui, selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules vivantes.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Concordance: mesure de performance pour les méthodes d'essai produisant des résultats catégoriels. Elle constitue un des aspects de la pertinence. Ce terme est parfois utilisé indifféremment à la place de « précision », et se définit comme la proportion de tous les produits chimiques d'essai qui ont été correctement classés comme positifs ou négatifs. La concordance dépend étroitement de la prévalence des résultats positifs dans les types de substances mises à l'essai (25).

TE₅₀: valeur pouvant être estimée en déterminant le temps d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application de la substance marqueur à une concentration fixe spécifiée. Voir également CI₅₀.

SGH de l'ONU [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1)

HPLC: Chromatographie Liquide Haute Performance.

IATA: Approches Intégrées d'Essai et d'Evaluation.

CI₅₀: valeur pouvant être estimée en déterminant la concentration d'une substance marqueur qui réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI₅₀) après un temps d'exposition déterminé. Voir également TE₅₀.

Dose infinie: quantité de substance d'essai appliquée sur la peau qui dépasse la quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface de l'épiderme.

Mélange: mélange ou solution composée de deux substances ou plus qui ne réagissent pas entre elles.

Substance mono-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un des constituants principaux est présent à hauteur d'au moins 80% (m/v).

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue tetrazolium bromide.

Substance multi-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant figure à une concentration supérieure à 10% (m/v) et inférieure à 80% (m/v). Une substance multi-constituant est le résultat d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituant est que le mélange est obtenu en mélangeant deux substances ou plus sans que celles-ci réagissent entre elles. Une substance multi-constituant est le résultat d'une réaction chimique.

NC: Non corrosif.

Témoin T_{mort} NS: témoin de couleur non-spécifique dans les tissus morts.

Témoin T_{vivant} NS: témoin de couleur non-spécifique dans les tissus vivants.

MTT NS: réduction non-spécifique du MTT.

DO: densité optique

Témoin positif: réplicat contenant tous les éléments du dispositif d'essai, traité au moyen d'un produit chimique connu pour induire une réponse positive. Afin de s'assurer que la variabilité des réponses du témoin positif peut être évaluée dans le temps, l'intensité de la réponse positive ne doit pas être excessive.

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: (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et (iii) les niveaux de fiabilité et de précision similaires à ceux obtenus avec 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 (25).

Pertinence: description de la relation entre la méthode d'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 (25).

Précision: 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. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de « concordance » pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (25).

Épreuve: consiste à tester une ou plusieurs substances d'essai parallèlement à un témoin négatif et à un témoin positif.

Sensibilité: proportion de l'ensemble des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (25).

Corrosion cutanée *in vivo*: survenue de lésions irréversibles de la peau. En l'occurrence, il s'agit de nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'une substance d'essai pendant une durée allant jusqu'à quatre heures. Les réactions corrosives se traduisent généralement par des ulcères, des saignements, des croûtes sanguinolentes et, à la fin de la période d'observation, soit à 14 jours, par une décoloration due au blanchissement de la peau, des zones complètes d'alopécie, et des cicatrices. Un examen histopathologique peut être envisagé pour évaluer les lésions sujettes à questionnement.

Sensibilité: proportion de l'ensemble des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par la méthode d'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats catégoriels, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (25).

Substance: un élément chimique et ses composés à l'état naturel ou obtenus par un processus de fabrication, y compris tout additif nécessaire pour préserver sa stabilité et toute impureté résultant du processus mis en œuvre, à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans affecter sa stabilité ni modifier sa composition.

UPLC: Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance.

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

Appendice 2

PRINCIPAUX ÉLÉMENTS DES MODÈLES D'ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ VALIDÉS POUR LES ESSAIS DE CORROSION CUTANÉE

Éléments du modèle d'essai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Surface du modèle	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²
Nombre de répliquats de tissus	Au moins 2 par temps d'exposition	2-3 par temps d'exposition	Au moins 2 par temps d'exposition	Au moins 2 par temps d'exposition
Doses de traitement et application	<u>Liquides et matières visqueuses</u>: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/cm²) <u>Solides</u>: 20 ± 2 mg (52,6 mg/cm²) + 100 µl ± 5µl de solution NaCl (9 g/l) <u>Cires/matières collantes</u>: 50 ± 2 mg (131,6 mg/cm²) avec tulle de nylon	<u>Liquides</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) avec ou sans tulle de nylon <i>Compatibilité pré-essai de la substance d'essai avec le tulle de nylon</i> <u>Semi-solides</u>: 50 µl (79,4 µl/cm²) <u>Solides</u>: 25 µl de H₂O (ou plus si nécessaire) + 25 mg (39,7 mg/cm²) <u>Cires</u>: disque plat d'environ 8 mm de diamètre placé par-dessus le tissu humidifié avec 15 µl de H₂O	<u>Liquides et matières visqueuses</u>: 40 µl ± 3 µl (80 µl/cm²) avec tulle de nylon <i>Compatibilité pré-essai de la substance d'essai avec le tulle de nylon</i> <u>Solides</u>: 20 µl ± 2 µl de H₂O + 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) <u>Cires /matières collantes</u>: 20 ± 3 mg (40 mg/cm²) avec tulle de nylon	<u>Liquides</u>: 50 µ, (83,3 µl/cm²) avec tulle de nylon <i>Compatibilité pré-essai de la substance d'essai avec le tulle de nylon</i> <u>Semi-solides</u>: 50 µl (83,3 µl/cm²) <u>Solides</u>: 25 mg (41,7 mg/cm²) + 25 µl de H₂O (ou plus si nécessaire) <u>Cires</u>: disque plat d'environ 8 mm de diamètre placé par-dessus le tissu humidifié avec 15 µl de H₂O

Éléments du modèle d'essai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Pré-vérification de la réduction directe du MTT	50 µl (liquides) ou 20 mg (solides) + 2 ml de MTT 0,3 mg/ml de solution pendant 180 ± 5 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus tués dans l'eau	50 µl (liquides) ou 25 mg (solides) + 1 ml de MTT 1 mg/ml de solution pendant 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus tués par congélation	40 µl (liquides) ou 20 mg (solides) + 1 ml de MTT 1 mg/ml de solution pendant 180± 15 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus tués par congélation	50 µl (liquides) ou 25 mg (solides) + 1 ml de MTT 1 mg/ml de solution pendant 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus tués par congélation
Pré-vérification des interférences de couleur	10 µl (liquides) ou 10 mg (solides) + 90 µl de H ₂ O mélangés pendant 15 min à TA → si la solution se colore, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus vivants	50 µl (liquides) ou 25 mg (solides) + 300 µl de H ₂ O pendant 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution se colore, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus vivants	40 µl (liquides) ou 20 mg (solides) + 300 µl de H ₂ O mélangés pendant 60 min à TA → si la substance d'essai se colore, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus vivants	50 µl (liquides) ou 25 mg (solides) + 300 µl de H ₂ O pendant 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 % → si la solution se colore, il convient de recourir à des témoins adaptés sur tissus vivants
Temps d'exposition et température	3 min, 60 min (± 5 min) et 240 min (± 10 min) en armoire ventilée à température ambiante (TA, 18-28°C)	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	3 min à TA, et 60 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %
Rinçage	25 ml 1x SSTP (2 ml/nettoyage)	20 fois à jet doux constant de 1x SSTP	20 fois à jet doux constant de 1x SSTP	20 fois à jet doux constant de 1x SSTP
Témoin négatif	50 µl de solution NaCl (9 g/L) Testé pour chaque temps d'exposition	50 µl de H ₂ O Testé pour chaque temps d'exposition	40 µl de H ₂ O Testé pour chaque temps d'exposition	50 µl de H ₂ O Testé pour chaque temps d'exposition

Éléments du modèle d'essai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Témoin positif	50 µl d'acide acétique glacial Testé pendant 4 heures seulement	50 µl d'hydroxyde de potassium 8N Testé pour chaque temps d'exposition	40 µl d'hydroxyde de potassium 8N Testé pendant 1 heure seulement	50 µl d'hydroxyde de potassium 8N Testé pour chaque temps d'exposition
Solution MTT	2 ml 0,3 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Durée et température d'incubation du MTT	180 min (± 15 min) à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	180 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	180 min (± 15 min) à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %	180 min à 37°C, sous CO ₂ 5 %, HR 95 %
Solvant d'extraction	500 µl d'isopropanol acidifié (0,04 de N HCl dans de l'isopropanol) (tissu isolé entièrement immergé)	2 ml d'isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)	1,5 ml d'isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)	2 ml d'isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)
Durée et température d'extraction	Pendant une nuit à TA, à l'abri de la lumière	Pendant une nuit sans agiter à TA ou pendant 120 min en agitant (~ 120 rpm) à TA	Pendant une nuit sans agiter à TA ou pendant 120 min en agitant (~ 120 rpm) à TA	Pendant une nuit sans agiter à TA ou pendant 120 min en agitant (~ 120 pm) à TA
Lecture de la DO	570 nm (545-595 nm) sans filtre de référence	570 nm (ou 540 nm) sans filtre de référence	570 nm (540- 600 nm) sans filtre de référence	540-570 nm sans filtre de référence
Contrôle de qualité des tissus	18 heures de traitement par SDS 1,0 mg/ml ≤ CI ₅₀ ≤ 3,0 mg/ml	Traitement par Triton X-100 à 1 % 4,08 heures ≤ TE ₅₀ ≤ 8,7 heures	Traitement par Triton X-100 à 1 % 4,0 heures ≤ TE ₅₀ ≤ 10,0 heures	Traitement par Triton X-100 à 1 % 2,0 heures ≤ TE ₅₀ ≤ 7,0 heures

Éléments du modèle d'essai	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®
Critères d'acceptabilité	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (NaCl) doit être $\geq 0,6$ et $\leq 1,5$ pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 4 heures au témoin positif (acide acétique glacial), exprimée en % du témoin négatif, doit être ≤ 20 % 3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les DO $\geq 0,3$, la différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 30 %	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H₂O) doit être $\geq 0,8$ et $\leq 2,8$ pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 1 heure au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être < 15 % 3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 %, le coefficient de variation (CV) entre les réplicats de tissus doit être ≤ 30 %	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H₂O) doit être $\geq 0,8$ et $\leq 3,0$ pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 1 heure (et 4 heures le cas échéant) au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être < 15 % 3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les DO $\geq 0,3$, la différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 30 %	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif (H₂O) doit être $\geq 0,8$ et $\leq 2,8$ pour chaque temps d'exposition 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 1 heure au témoin positif (hydroxyde de potassium 8N), exprimée en % du témoin négatif, doit être < 20 % 3. Dans la plage de viabilité entre 20 % et 100 % et pour les DO $\geq 0,3$, la différence de viabilité entre les deux réplicats ne doit pas dépasser 30%.

Appendice 3

PERFORMANCE DES MODÈLES D’ESSAI EN MATIÈRE DE SOUS-CATÉGORISATION

Le tableau ci-dessous illustre les performances des quatre modèles d’essai, déterminées à partir d’un ensemble de 80 produits chimiques testés par les quatre développeurs. Les calculs ont été réalisés par le Secrétariat de l’OCDE, puis revus et approuvés par un sous-groupe d’experts (21) (23).

Les modèles d’essai EpiSkinTM, EpiDermTM, SkinEthicTM et epiCS[®] sont à même de permettre une sous-catégorisation (1A vs 1B et 1C vs substances non corrosives)

Performances, taux de surclassification, taux de sous-classification et précision (valeur prédictive) des quatre modèles d’essai à partir d’un ensemble de 80 produits chimiques, tous testés lors de 2 ou 3 épreuves pour chaque modèle d’essai:

STATISTIQUES SUR LES PRÉDICTIONS OBTENUES SUR L'ENSEMBLE COMPLET DE PRODUITS CHIMIQUES

(n = 80 produits chimiques, testés lors de 2 épreuves indépendantes pour epiCS® ou 3 épreuves indépendantes pour EpiDerm™, EpiSkin™, SkinEthic™RHE, respectivement, soit 159* ou 240 classifications)

* un produit chimique n'a pu être testé qu'une seule fois avec epiCS® car indisponible (23)

	EpiDerm™	EpiSkin™	SkinEthic™	epiCS®
Surclassifications:				
Produits chimiques de cat. 1BC surclassés en 1A	29,0 %	21,50 %	31,2 %	32,8%
Produits chimiques non corrosifs surclassés en 1BC	23,4 %	20,7 %	27,0 %	28,4%
Produits chimiques non corrosifs surclassés en 1A	2,7 %	0,00 %	0,0 %	0,00%
Produits chimiques non corrosifs surclassés comme corrosifs	26,1 %	20,7 %	27,0 %	28,4%
Taux global de surclassification (toutes catégories)	23,3 %	17,9 %	24,5 %	25,8%
Sous-classifications:				
Produits chimiques de cat. 1A sous-classés en 1BC	16,7 %	16,7 %	16,7 %	12,5%
Produits chimiques de cat. 1A sous-classés comme non corrosifs	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00%
Produits chimiques de cat. 1BC sous-classés comme non corrosifs	0,00 %	2,2 %	7,5 %	6,6%
Taux global de sous-classification (toutes catégories)	2,5 %	3,3 %	5,4%	4,4%
Classifications correctes:				
Correctement classés en 1A	83,3 %	83,3 %	83,3 %	87,5%
Correctement classés en 1BC	71,0 %	76,3 %	61,3 %	60,7%
Correctement classés comme non corrosifs	73,9 %	79,3 %	73,0 %	71,6%
Précision (Valeur prédictive)	74,2 %	78,8 %	70,0 %	69,8%

Appendice 4

Paramètres fondamentaux et critères d'acceptabilité pour la qualification d'un système de spectrophotométrie HPLC/UPL pour quantifier le formazan des extraits tissulaires.

Paramètre	Protocole dérivé d'un document d'orientation de la <i>Food and Drug Administration</i> (37) (38)	Critère d'acceptabilité
Sélectivité	Analyse de l'isopropanol, blanc vivant (isopropanol extrait de tissu vivant non traité), blanc mort (isopropanol extrait de tissu mort non traité)	$\frac{\text{Surface}_{\text{interférence}}}{\text{surface}_{\text{LBQ}^1}} \leq 20\%$
Précision	Contrôles de qualité (càd. Formazan à 1,6 µg /ml, 16 µg /ml et 160 µg /ml) dans l'isopropanol (n=5)	$\text{CV} \leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ pour la LBQ
Exactitude	Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	% Dev $\leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ pour la LBQ
Effet matriciel	Contrôles de qualité dans le blanc vivant	$85\% \leq \text{Effet matriciel} \leq 115\%$
Report	Analyse de l'isopropanol après un standard de LHQ ²	$\frac{\text{Surface}_{\text{interférence}}}{\text{surface}_{\text{LBQ}}} \leq 20\%$
Reproductibilité (dans la journée)	3 courbes indépendantes de calibration (sur la base de dilutions consécutives à 1/3 de formazan dans l'isopropanol, en partant de la LBQ, càd. 200 µg /ml); contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	Etalonnage Courbes: %Dev $\leq 15\%$ ou $\leq 20\%$ pour LBQ Qualité Témoins: %Dev $\leq 15\%$ et $\text{CV} \leq 15\%$
Reproductibilité (d'un jour à l'autre)	Jour 1: une courbe de calibration et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 2: une courbe de calibration et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 3: une courbe de calibration et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3)	
Stabilité à court terme du formazan dans un extrait tissulaire	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysés le jour de la préparation et après 24h de stockage à température ambiante.	% Dev $\leq 15\%$
Stabilité à long terme du formazan dans un extrait tissulaire	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysés le jour de la préparation et plusieurs jours de stockage à des températures spécifiques (p.ex. 4°C, -20°C, -80°C).	% Dev $\leq 15\%$

¹ LBQ: Limite Basse de Quantification, définie par une couverture de 1-2% de viabilité tissulaire, c'est-à-dire 0,8 µg/ml.

² LHQ: Limite Haute de Quantification, définie pour être au moins deux fois supérieure à la détection maximale attendue de concentration de formazan dans les extraits d'isopropanol des témoins négatifs, c'est-à-dire 200 µg/ml.»

(7) Dans la partie B, le chapitre B.46 est remplacé par le texte suivant:

«B.46 IRRITATION CUTANÉE *IN VITRO*: ESSAI SUR ÉPIDERME HUMAIN RECONSTITUÉ

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 439 (2015) de l'OCDE. L'irritation cutanée désigne l'apparition sur la peau de lésions réversibles à la suite de l'application d'un produit chimique pendant une période allant jusqu'à quatre heures [selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU)] (1) et le règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (ci-après le «règlement CLP»)¹. La présente méthode d'essai propose une procédure *in vitro* pouvant servir à identifier les dangers liés aux produits chimiques (substances et mélanges) irritants, classés en catégorie 2, telle que définie par le SGH de l'ONU/le règlement CLP (2). Pour les régions n'ayant pas adopté la catégorie 3 facultative (produits chimiques faiblement irritants) selon le SGH de l'ONU, la présente méthode d'essai peut aussi servir à identifier des produits chimiques non classés. Par conséquent, suivant le cadre réglementaire et le système de classification en vigueur, cette méthode d'essai peut être utilisée pour déterminer le pouvoir irritant pour la peau d'un produit chimique, en tant que méthode de substitution à part entière remplaçant l'essai d'irritation cutanée *in vivo*, ou en tant que méthode substitutive partielle, dans le cadre d'une stratégie d'essai (3).
2. Jusqu'à présent, l'évaluation de l'irritation cutanée impliquait généralement le recours à des animaux de laboratoire [méthode d'essai B.4, équivalente à la ligne directrice 404 de l'OCDE, adoptée en 1981 et révisée en 1992, 2002 et 2015] (4). Pour tester le potentiel de corrosivité, trois méthodes d'essai *in vitro* validées ont été adoptées: elles constituent respectivement les lignes directrices 430, 431 et 435 de l'OCDE (5) (6) (7). Un Document Guide de l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation (IATA) pour l'irritation et la corrosion de la peau décrit plusieurs modules qui rassemblent les sources d'information et les outils d'analyse et (i) fournit des orientations sur la façon d'intégrer et d'utiliser les données d'essais et autres données pour l'évaluation du potentiel d'irritation

¹ Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) no 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

ou de corrosion de la peau des produits chimiques d'essai (ii) propose une approche quand des essais supplémentaires sont requis (3).

3. La présente méthode d'essai porte sur le danger d'irritation cutanée pour la santé humaine. Elle fait appel à un système d'essai *in vitro* utilisant un épiderme humain reconstitué qui reproduit fidèlement les propriétés biochimiques et physiologiques des couches supérieures de la peau humaine, c'est-à-dire l'épiderme. Le système d'épiderme humain reconstitué utilise des dérivés de kératinocytes humains non transformés comme source cellulaire afin de reconstruire un modèle d'épiderme comprenant une cyto-architecture et une histologie représentatives. Un ensemble de normes de performance ont été développées afin de faciliter la validation et l'évaluation de méthodes d'essai sur épiderme humain reconstitué similaires ou modifiées, conformément aux principes du document d'orientation n°34 de l'OCDE (8) (9). La présente méthode d'essai a été initialement adoptée en 2010, puis mise à jour une première fois en 2013 afin d'y inclure de nouvelles méthodes d'essai faisant usage du modèle de peau humaine reconstituée, puis une seconde fois en 2015 afin d'y inclure la référence au document guide IATA et d'y introduire une procédure alternative de mesure de la viabilité cellulaire.
4. Des études de pré-validation, d'optimisation et de validation ont été réalisées pour quatre modèles d'essai *in vitro* disponibles dans le commerce (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) utilisant un modèle d'épiderme humain reconstitué (sensibilité de 80%, spécificité de 70% et précision de 75%). Ces quatre modèles d'essai sont inclus dans la présente méthode d'essai et sont énumérés dans l'appendice 2 qui fournit également des informations sur le type d'étude de validation menée pour valider chaque méthode respectivement. Comme noté dans l'appendice 2, la méthode de référence validée (MRV) a été utilisée pour développer la présente méthode d'essai, y compris les normes de performance (8).
5. L'acceptation mutuelle des données ne sera garantie pour les modèles d'essai validés selon les normes de performance (8) que si ces modèles d'essai ont été examinés et adoptés par l'OCDE. Les modèles d'essai inclus dans la présente méthode d'essai et dans la ligne directrice correspondante de l'OCDE peuvent être utilisés sans discrimination dans le but de répondre aux exigences réglementaires des pays et de générer des résultats d'essai issus de l'une des méthodes d'essai *in vitro* sur l'irritation de la peau, tout en bénéficiant de l'acceptation mutuelle des données.
6. Les définitions des termes utilisés dans ce document figurent à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

7. L'une des limites de la présente méthode d'essai, comme l'a démontré l'étude de validation prospective complète évaluant et caractérisant les méthodes d'essai sur l'épiderme humain reconstitué (16), est qu'elle ne permet pas la classification des produits chimiques dans la

catégorie facultative 3 (produits chimiques faiblement irritants) du SGH de l'ONU (1). Par conséquent, son utilisation sera fonction de la réglementation en vigueur dans les pays membres. Pour une évaluation complète des effets cutanés locaux faisant suite à une exposition unique, le document guide n° 203 de l'OCDE sur les Approches Intégrées pour les Essais et l'Évaluation doit être consulté (3). Il est entendu que l'utilisation de peau humaine est soumise à des conditions et considérations d'éthique nationales et internationales.

8. La présente méthode d'essai se rapporte aux effets d'irritation de la peau humaine. Si elle ne fournit pas d'informations appropriées sur la corrosion cutanée, on notera cependant que la méthode d'essai B.40 *bis* (équivalente à la méthode d'essai 431 de l'OCDE) relative à la corrosion cutanée, bien que faisant appel à un protocole différent, est basée sur le même système d'essai sur épiderme humain reconstitué (6). La présente méthode d'essai a recours à des modèles d'épiderme humain reconstitué utilisant des kératinocytes humains, et reproduisant donc in vitro l'organe cible de l'espèce étudiée. De plus, elle couvre directement l'étape initiale de la cascade inflammatoire/du mécanisme d'action (lésions cellulaires et tissulaires causant un traumatisme localisé) survenant au cours de l'irritation in vivo. Les essais réalisés dans le cadre de l'étude de validation sous-tendant cette méthode d'essai ont porté sur un large éventail de produits chimiques; la base de données de cette étude totalisait 58 produits chimiques (16) (18) (23). La présente méthode d'essai peut être utilisée pour tester des solides, des liquides, des semi-solides et des cires. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Si possible, les solides sont moulus finement avant application; aucun autre prétraitement de l'échantillon n'est nécessaire. Les gaz et les aérosols n'ont pas encore fait l'objet d'une étude de validation (29). Bien qu'il soit envisageable de pouvoir tester des gaz et des aérosols en faisant appel à de l'épiderme humain reconstitué, l'actuelle méthode d'essai ne permet pas de tester les produits de ce type.
9. Avant d'utiliser la présente méthode d'essai pour tester un mélange afin de générer des données dans un but réglementaire, il convient de s'assurer et de justifier le cas échéant, que les données générées seront adéquates. De telles dispositions ne sont pas nécessaires quand il existe une exigence réglementaire de tester le mélange. Cependant, du fait que les mélanges couvrent une large gamme de catégories et de composition, et que l'information sur les essais de mélanges est encore parcellaire, il convient de ne pas utiliser la présente méthode d'essai pour une catégorie spécifique de mélanges quand il a été démontré que cette méthode ne s'applique pas à cette catégorie spécifique (par exemple en suivant la stratégie proposée par Eskes et al en 2012 (30)). Des précautions similaires doivent être prises dans les cas où des classes ou des propriétés physico-chimiques spécifiques limitent l'utilisation de la méthode d'essai.
10. Les produits chimiques d'essai absorbant la lumière dans la même gamme que le MTT formazan et les produits chimiques d'essai capable de réduire de façon directe le colorant

vital MTT (en MTT formazan) peuvent interférer avec les mesures de viabilité cellulaire et requièrent l'utilisation de témoins adaptés pour la correction (voir paragraphes 28 à 34).

11. Une seule expérience réalisée à l'aide de trois réplicats de tissus identiques devrait suffire pour tester les produits chimiques dont la classification est sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents réplicats et/ou une viabilité moyenne égale à $50 \pm 5 \%$, une seconde expérience est envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.

PRINCIPE DE L'ESSAI

12. Le produit chimique est appliqué localement sur un modèle tridimensionnel d'épiderme humain reconstitué, composé de kératinocytes non transformés prélevés sur épiderme humain et mis en culture pour former un modèle multicouche hautement différencié d'épiderme humain. Ce modèle se compose de couches organisées (basale, épineuse et granuleuse), ainsi que d'un stratum corneum multicouche contenant des couches lipidiques lamellaires intercellulaires représentant les principales classes de lipides, similaires à celles que l'on observe in vivo.
13. L'irritation cutanée consécutive à l'application d'un produit chimique, qui se manifeste principalement par des érythèmes ou des œdèmes, résulte d'une cascade d'événements débutant par la pénétration du produit chimique à travers le stratum corneum où il peut causer la lésion des couches sous-jacentes de kératinocytes et les autres cellules de la peau. En mourant, les cellules lésées peuvent soit rejeter des médiateurs de l'inflammation ou induire la cascade inflammatoire qui agit aussi sur les cellules du derme, en particulier les cellules stromales et endothéliales des vaisseaux sanguins. C'est la dilatation et la perméabilité accrue des cellules endothéliales qui sont responsables des érythèmes et des œdèmes observés (29). Il faut noter que les méthodes d'essai fondées sur l'utilisation d'épiderme humain reconstitué permettent de mesurer les événements déclencheurs de la cascade, p.ex. les lésions cellulaires et tissulaires (16) (17), en l'absence de toute vascularisation du système d'essai in vitro, grâce à la lecture de la viabilité cellulaire.
14. La viabilité cellulaire des modèles d'épiderme humain reconstitué est mesurée via la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, numéro CAS 298-93-1] en un sel de formazan bleu mesuré quantitativement après son extraction des tissus (31). Les produits chimiques irritants sont mis en évidence par leur capacité à faire chuter la viabilité cellulaire sous un seuil prédéterminé ($\leq 50 \%$, pour la catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP). En fonction du cadre législatif et de l'applicabilité de la présente méthode d'essai, les produits chimiques d'essai produisant une viabilité cellulaire supérieure au seuil défini peuvent être considérés comme non irritants ($> 50 \%$, sans catégorie).

DEMONSTRATION DES COMPÉTENCES

15. Avant d'appliquer en routine l'un des quatre modèles d'essai validés conformément à la présente méthode d'essai (appendice 2), les laboratoires font la preuve de leur compétence technique en utilisant les 10 substances énumérées au tableau 1. Dans le cas où une substance figurant dans le tableau 1 serait indisponible, ou dans d'autres cas où il est justifié de la remplacer par une autre substance (par exemple à partir de la liste de substances de référence (8)), cette autre substance peut être utilisée si des données de référence appropriées *in vivo* et *in vitro* sont disponibles, et dans la mesure où les mêmes critères de sélection que ceux décrits sous le tableau 1 sont utilisés. L'utilisation d'une substance d'épreuve de compétence autre que celles énumérées au tableau 1 doit être justifiée.
16. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé aux utilisateurs de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Cette étape est particulièrement importante lorsque les tissus sont transportés sur de longues distances/durées. Lorsqu'une méthode d'essai a été établie avec succès, et que le laboratoire a acquis et démontré sa maîtrise de cette méthode, il ne sera plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification. Toutefois, pour les méthodes d'essai utilisées en routine, il est recommandé de continuer à évaluer les propriétés de barrière des tissus à intervalles réguliers.

Tableau 1: Substances utilisées pour les épreuves de compétence¹

Substance	Numéro CAS	Score <i>in vivo</i> ²	État physique	Catégorie du SGH de l'ONU
SUBSTANCES NON CLASSÉES (Sans catégorie dans le SGH de l'ONU)				
Acide naphtylacétique	86-87-3	0	Solide	sans catégorie
isopropanol	67-63-0	0,3	liquide	sans catégorie
stéarate de méthyle	112-61-8	1	solide	sans catégorie
butyrate d'heptyle	5870-93-9	1,7	liquide	sans catégorie (cat. 3 facultative) ³
salicylate d'hexyle	6259-76-3	2	liquide	sans catégorie (cat. 3 facultative) ³
SUBSTANCES CLASSÉES (Catégorie 2 du SGH de l'ONU)				
3-p-cuményl-2-méthylpropionaldéhyde	103-95-7	2,3	liquide	catégorie 2
1-bromohexane	111-25-1	2,7	liquide	catégorie 2
hydroxyde de potassium (solution aqueuse à 5 %)	1310-58-3	3	liquide	catégorie 2
1-méthyl-3-phényl-1-pipérazine	5271-27-2	3,3	solide	catégorie 2
heptanal	111-71-7	3,4	liquide	catégorie 2

¹ Ces produits chimiques constituent un sous-ensemble des produits chimiques utilisés dans l'étude de validation

et leur sélection repose sur les critères suivants: (i) les substances chimiques sont disponibles dans le commerce, (ii) ils sont représentatifs de la gamme de scores d'irritation obtenus avec le test de Draize (de non-irritant à fortement irritant), (iii) ils ont une structure chimique bien définie, (iv) ils sont représentatifs des fonctions chimiques utilisées dans le processus de validation, (v) ils ont donné des résultats in vitro au cours des nombreux essais dans de nombreux laboratoires, (vi) ils ont fourni des prédictions in vitro correctes, et (vii) ils ne sont pas associés à un profil extrêmement toxique (par exemple cancérigène ou toxique pour la reproduction) et ils ne sont pas associés à des coûts de recyclage prohibitifs).

2 Score in vivo d'après la méthode d'essai B.4 (4).

3 Dans cette méthode d'essai, les substances classées dans la catégorie facultative 3 du SGH de l'ONU (matières faiblement irritantes) (1) sont considérées comme «sans catégorie».

PROTOCOLE

17. Les éléments et le protocole d'une méthode d'essai d'irritation cutanée sur épiderme humain reconstitué sont décrits ci-après (voir aussi l'annexe 3 concernant les paramètres liés à chaque modèle d'essai). Il existe des modes opératoires normalisés pour les quatre modèles d'essai contenus dans la méthode d'essai (32) (33) (34) (35).

ELEMENTS DE LA METHODE D'ESSAI SUR EPIDERME HUMAIN RECONSTITUE

Conditions générales

18. L'épiderme est reconstruit à partir de kératinocytes humains non transformés. Plusieurs couches de cellules épithéliales viables (couche basale, stratum spinosum, stratum granulosum) doivent être présentes sous un stratum corneum fonctionnel. Le stratum corneum doit comporter plusieurs couches présentant le profil lipidique nécessaire pour constituer une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide de substances cytotoxiques de référence telles que le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou le Triton X-100. La fonction de barrière est démontrée et peut être évaluée soit en déterminant la concentration à laquelle une substance de référence réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI₅₀) après un temps d'exposition donné, soit en définissant le temps d'exposition requis pour réduire la viabilité des cellules de 50 % (TE₅₀) après application de la substance de référence à une concentration fixe déterminée. Le modèle d'épiderme humain reconstitué présente des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que de la matière puisse contourner le stratum corneum pour atteindre les tissus viables, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition cutanée. Enfin, le modèle est exempt de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmaïque ou mycosique.

Conditions fonctionnelles

Viabilité

19. L'essai utilisé pour quantifier la viabilité est l'essai MTT (31). Les cellules viables de l'épiderme humain reconstruit peuvent réduire le colorant vital MTT en un précipité bleu de MTT formazan qui est alors extrait des tissus au moyen de l'isopropanol (ou un solvant

similaire). La densité optique du solvant d'extraction seul doit être suffisamment faible, c'est-à-dire inférieur à 0,1. Le MTT formazan extrait peut être quantifié soit par la mesure de l'absorbance standard (DO) ou par une procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC (36). Les utilisateurs du modèle d'épiderme humain reconstitué font en sorte que chaque lot utilisé réponde aux critères définis pour le témoin négatif (TN). Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour le témoin négatif (dans les conditions de la méthode d'essai d'irritation cutanée) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué. Les plages d'acceptabilité pour les quatre modèles validés comprises dans cette méthode d'essai sont indiquées dans le tableau 2. L'utilisateur de spectrophotométrie HPLC-UPLC utilisera la gamme de DO du témoin négatif fournie au tableau 2 comme critère pour le contrôle négatif. Il doit être prouvé que les tissus traités par le témoin négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de viabilité comparables) tout au long de la période d'exposition.

Tableau 2: Plages d'acceptabilité des valeurs de DO du témoin négatif des modèles d'essai de cette MRV

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiSkin™ (SM)	$\geq 0,6$	$\leq 1,5$
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	$\geq 0,8$	$\leq 2,8$
SkinEthic™ RHE	$\geq 0,8$	$\leq 3,0$
LabCyte EPI-MODEL24 SIT	$\geq 0,7$	$\leq 2,5$

Fonction de barrière

20. Le *stratum corneum* et sa composition lipidique doivent être suffisants pour résister à la pénétration rapide de substances cytotoxiques de référence telles que le SDS ou le Triton X-100. Cette capacité est évaluée par la CI_{50} et le TE_{50} (tableau 3).

Morphologie

21. L'examen histologique du modèle d'épiderme humain reconstitué doit mettre en évidence une structure semblable à celle de l'épiderme humain (comprenant notamment un *stratum corneum* multicouche).

Reproductibilité

22. La reproductibilité dans le temps des résultats obtenus à l'aide des témoins positifs et négatifs doit être démontrée.

Contrôle de qualité

23. Il est impératif que le développeur/fournisseur du modèle d'épiderme humain reconstitué garantisse et démontre que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la *viabilité* (paragraphe 19), à la *fonction de barrière* (paragraphe 20) et à la *morphologie* (paragraphe 21). Ces informations sont communiquées aux utilisateurs, afin qu'ils puissent les inclure dans le rapport d'essai. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs IC_{50} ou TE_{50} est établie par le développeur/fournisseur d'épiderme humain. Seuls les résultats obtenus à l'aide de tissus répondant à ces critères pourront être retenus pour prédire de façon fiable les effets irritants des produits chimiques d'essai. Les plages d'acceptabilité pour les quatre modèles d'essai inclus dans la présente méthode d'essai sont indiquées dans le tableau 3.

Tableau 3: Critères de contrôle de qualité des lots pour les modèles d'essai inclus dans la présente méthode d'essai

	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
EpiSkin™ (SM) (18 hours treatment with SDS) (32)	$IC_{50} = 1,0 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 3,0 \text{ mg/ml}$
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1% Triton X-100) (33)	$ET_{50} = 4,0 \text{ hr}$	$ET_{50} = 8,7 \text{ hr}$
SkinEthic™ RHE (1% Triton X-100) (34)	$ET_{50} = 4,0 \text{ hr}$	$ET_{50} = 10,0 \text{ hr}$
LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 hours treatment with SDS) (35)	$IC_{50} = 1,4 \text{ mg/ml}$	$IC_{50} = 4,0 \text{ mg/ml}$

Application des produits chimiques d'essai et des produits chimiques témoins

24. Il convient d'utiliser au minimum trois réplicats par essai pour chaque produit chimique d'essai et pour les témoins. Pour les produits chimiques liquides comme pour les produits chimiques solides, il convient d'appliquer une quantité suffisante de produit chimique pour recouvrir uniformément la surface de la peau, sans pour autant utiliser une dose infinie, c'est à dire dans une gamme de 26 à 83 $\mu\text{L/cm}^2$ ou mg/cm^2 (voir l'appendice 3). Dans le cas de produits chimiques solides, il convient d'humidifier la surface de l'épiderme avec de l'eau déionisée ou distillée avant application, afin d'assurer un bon contact entre la substance d'essai et la surface de l'épiderme. Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. Un filet en nylon peut être utilisé pour aider l'étalement de la poudre en couche fine si nécessaire (voir appendice 3). À la fin de la période d'exposition, la surface de l'épiderme est nettoyée avec soin à l'aide d'un tampon aqueux ou de NaCl à 0,9 %, afin d'éliminer le produit chimique d'essai. En fonction de la méthode sur épiderme humain reconstitué utilisée, la période d'exposition peut s'étendre de entre 15 à 60 minutes et la température d'incubation entre 20 et 37°C. Les durées et températures d'exposition sont optimisées pour chacun des modèles d'essai sur épiderme humain reconstitué, et tiennent compte des propriétés intrinsèques de chaque modèle (p. ex. la fonction de barrière) (voir appendice 3).

25. Des témoins négatifs (TN) et positifs (TP) sont utilisés simultanément pour chaque étude afin de démontrer que la viabilité (dans le cas du TN), la fonction de barrière et la sensibilité tissulaire qui en résulte (dans le cas du TP) se situent dans une fourchette historique définie de valeurs acceptables. La substance recommandée en tant que TP est une solution aqueuse de SDS à 5 %. Pour les TN, il est recommandé d'utiliser de l'eau ou une solution saline tamponnée au phosphate [phosphate buffered saline (PBS)].

Mesures de la viabilité cellulaire

26. Selon le protocole, il est essentiel que mesures de la viabilité ne soient pas réalisées immédiatement après l'exposition au produit chimique d'essai, mais après une période d'incubation post-traitement suffisamment longue du tissu rincé dans un milieu frais. Cette période permet aussi bien la disparition des effets faiblement cytotoxiques que l'apparition d'effets cytotoxiques manifestes. Une période d'incubation post-traitement de 42 heures s'est révélée optimale au cours de l'optimisation de deux des modèles d'essai basés sur l'épiderme humain reconstitué sous-tendant cette méthode d'essai (11)(12)(13)(14)(15).
27. Le test du MTT est une méthode quantitative standardisée, recommandée pour mesurer la viabilité cellulaire dans le cadre de cette méthode d'essai. Elle est compatible avec une utilisation sur un modèle tissulaire tridimensionnel. L'échantillon de tissu est placé dans une solution MTT à la concentration appropriée (par exemple, 0,3-1 mg/ml) pendant 3 heures. Le MTT est converti en bleu de formazan par les cellules viables. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un solvant (ex.: isopropanol, isopropanol acide), et l'on mesure la concentration du formazan en déterminant sa DO à 570 nm à l'aide d'un filtre passe-bande de ± 30 nm au maximum, ou en utilisant une procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC (voir paragraphe 34) (36).
28. Les propriétés optiques du produit chimique d'essai ou son action chimique sur le MTT (p. ex. les produits chimiques peuvent aussi bien inhiber ou faire disparaître la coloration que la provoquer) sont susceptibles d'interférer avec l'expérience et de conduire à une estimation erronée de la viabilité. Cela peut se produire lorsque le produit chimique d'essai n'a pas été totalement éliminé du tissu par rinçage ou lorsqu'il a pénétré dans l'épiderme. Si un produit chimique agit directement sur le MTT (p. ex. un agent réducteur du MTT), est naturellement coloré, ou s'il se colore durant le traitement du tissu, des contrôles supplémentaires sont pratiqués pour détecter et corriger les interférences du produit chimique avec la mesure de la viabilité (voir paragraphes 29 et 33). On trouvera une description détaillée de la manière de corriger la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants dans le mode opératoire normalisé des quatre modèles d'essai validés contenus dans cette méthode d'essai (32) (33) (34) (35)..
29. Afin d'identifier les agents réducteurs directs du MTT, il convient d'ajouter chaque produit chimique d'essai à un milieu MTT fraîchement préparé. Si le mélange de MTT et de produit chimique d'essai (ou la suspension testée pour les produits chimiques d'essai

insolubles) devient bleu/violet, on considère que le produit chimique d'essai est un réducteur direct du MTT et il convient alors de procéder à des vérifications fonctionnelles supplémentaires sur les modèles d'épiderme humain reconstruit non viables, indépendamment du choix de mesurer l'absorbance (OD) ou de procéder par analyse par HPLC/UPLC-spectrophotométrie. Cette vérification s'effectue sur des tissus tués qui ne présentent qu'une activité métabolique résiduelle, mais absorbent et retiennent le produit chimique d'essai dans des proportions similaires aux tissus viables. Chaque produit chimique réducteur du MTT est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la procédure d'essai complète pour générer un témoin de réduction non spécifique du MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Un seul témoin MTT NS par produit chimique d'essai suffit, indépendamment du nombre d'épreuves indépendantes menées. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au réducteur du MTT ($\%viabilité_{test}$) moins le pourcentage de réduction non spécifique du MTT obtenu pour les tissus tués exposés au même réducteur du MTT et calculé en proportion du témoin négatif testé en parallèle de l'essai à corriger ($\%MTT\ NS$), soit Viabilité tissulaire réelle = [$\%viabilité_{test}$] - [$\%MTT\ NS$].

30. Pour repérer les interférences potentielles par des produits chimiques d'essai colorés ou qui deviennent colorés en contact avec l'eau ou l'isopropanol, et pour déterminer si des témoins supplémentaires sont nécessaires, une analyse de spectre est menée sur les produits chimiques dans l'eau (environnement au moment de l'exposition) et/ou dans l'isopropanol (solvant d'extraction). Si le produit chimique d'essai dans l'eau et/ou dans l'isopropanol absorbe assez la lumière à une longueur d'onde de 570 ± 30 nm, alors on considère que le produit chimique d'essai interfère avec la mesure de l'absorbance (DO) du formazan et des témoins colorés doivent être préparés, ou bien une procédure d'analyse par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est employée et aucun témoin supplémentaire n'est nécessaire (voir paragraphes 33 et 34). Lorsque les mesures d'absorbance (DO) sont effectuées, chaque produit chimique d'essai causant une interférence est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus viables, et les deux réplicats sont soumis à la procédure d'essai complète, à la seule différence qu'ils sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape de l'incubation avec MTT, afin de générer un témoin de couleur non spécifique dans les tissus vivants ($T_{vivants}\ NS$). Le témoin $T_{vivants}\ NS$ est testé en parallèle de l'essai avec le produit chimique d'essai coloré et, dans le cas d'un essai multiple, un témoin $T_{vivants}\ NS$ indépendant est effectué pour chaque essai (dans chaque épreuve) pour tenir compte de la variabilité biologique inhérente aux tissus vivants. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une interférence et incubés avec la solution MTT ($\%viabilité_{test}$) moins le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une

interférence et incubés dans du milieu sans MTT en parallèle de l'essai à corriger (%T_{vivants} NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité_{test}] - [%T_{vivants} NS]..

31. Dans le cas des produits chimiques identifiés comme causant à la fois une réduction directe du MTT (voir paragraphe 29) et une interférence de couleurs (voir paragraphe 30), une troisième série de témoins est nécessaire lors de la mesure de l'absorbance (DO), en plus des témoins MTT NS et T_{vivants} NS décrits aux paragraphes précédents. En général, ce cas se présente pour les produits chimiques d'essai foncés (bleus, violets, noirs, par exemple), car leur couleur intrinsèque empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT décrite au paragraphe 29. Cela rend la réalisation des témoins MTT NS et T_{vivants} NS obligatoires par principe. Les produits chimiques d'essai nécessitant la réalisation des deux témoins NSMTT et CNS_{vivants} sont susceptibles d'être absorbés et retenus à la fois par les tissus vivants et par les tissus tués. Par conséquent et dans ce cas, l'utilisation du témoin NSMTT peut permettre de corriger l'essai non seulement en fonction du potentiel de réduction directe du MTT du produit chimique d'essai, mais aussi de l'interférence de couleurs due à l'absorption et la rétention du produit chimique d'essai par les tissus tués. Cela signifie qu'une double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs peut devoir être effectuée, étant donné que le témoin T_{vivants} NS permet déjà de tenir compte de l'interférence de couleurs due à l'absorption et à la rétention du produit chimique d'essai par les tissus vivants. Afin d'éviter cette double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs, un troisième témoin pour la couleur non spécifique dans les tissus tués (T_{morts} NS) doit être préparé. Dans ce témoin supplémentaire, le produit chimique d'essai est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la procédure d'essai complète mais qui sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape d'incubation avec MTT. Un seul témoin T_{morts} NS par produit chimique d'essai suffit, indépendamment du nombre d'épreuves, mais il doit être mené en parallèle du témoin NSMTT et sur le même lot de tissus. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique d'essai (%viabilité_{test}) moins %NSMTT moins % T_{vivants} NS plus le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus tués exposés au produit chimique d'essai causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT, calculé en proportion du témoin négatif mené en parallèle de l'essai à corriger (%T_{morts} NS), soit Viabilité tissulaire réelle = [%viabilité_{test}] - [%MTT NS] - [%T_{vivants} NS] + [%T_{morts} NS]..
32. Il importe de noter qu'une réduction non spécifique du MTT et des interférences de couleurs non spécifiques peuvent porter l'absorbance (DO) de l'extrait tissulaire au-dessus de la plage de linéarité du spectrophotomètre (lors des mesures de densité optique), et qu'une réduction non spécifique du MTT peut aussi élargir la surface de pic de formazan de l'extrait tissulaire au-delà de la plage de linéarité du spectrophotomètre (lors des mesures par HLCP/UPLC-spectrophotométrie). Il est donc important que chaque

laboratoire détermine la plage de linéarité de son spectrophotomètre (pour la DO/surface de pic), par exemple à l'aide de formazan (CAS # 57360-69-7), disponible dans le commerce auprès de l'entreprise Sigma-Aldrich (Cat# M2003), avant de tester les produits chimiques à des fins réglementaires. Les mesures d'absorbance standard (DO) au moyen d'un spectrophotomètre sont pertinentes pour évaluer les réducteurs directs du MTT et les produits chimiques d'essai colorés quand la DO des extraits de tissus traités par le produit chimique d'essai sans correction pour la réduction directe du MTT et/ou pour les interférences de couleur sont dans la plage de linéarité du spectrophotomètre ou quand le pourcentage de viabilité non-corrigée obtenu avec le produit chimique d'essai est $\leq 50\%$. Néanmoins, les résultats pour les produits chimiques d'essai indiquant % MTT NS et/ou $T_{\text{vivants NS}} \geq 50\%$ du témoin négatif doivent être interprétés avec précaution car ce seuil représente la limite utilisée pour différencier les produits chimiques classés des non-classés (voir paragraphe 36).

33. Pour les produits chimiques d'essai colorés qui ne sont pas compatibles avec la mesure de l'absorbance standard (DO) à cause de leur forte interférence avec l'essai de MTT, peuvent être évalués par une procédure de HPLC/UPLC-spectrophotométrie (voir paragraphe 34) (36). Le système HPLC/UPLC permet de séparer le formazan du produit chimique avant la quantification (36). Pour cette raison, les témoins $T_{\text{vivants NS}}$ et $T_{\text{morts NS}}$ ne sont pas nécessaires pour la procédure HPLC/UPLC-spectrophotométrie, quel que soit le produit chimique d'essai. Les témoins MTT NS sont néanmoins nécessaires si l'on s'attend à ce que le produit chimique d'essai soit un réducteur direct du MTT, ou que la couleur empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT (en suivant la procédure décrite au paragraphe 29). Lorsqu'une procédure par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est employée pour quantifier le formazan, la viabilité tissulaire est calculée en pourcentage par comparaison de la surface de pic de formazan obtenue avec des tissus vivants exposés au produit chimique d'essai avec la surface de pic de formazan obtenue avec le témoin négatif parallèle. Pour les produits chimiques d'essai réducteurs directs du MTT, la viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: $\% \text{viabilité}_{\text{test}} \text{ moins } \% \text{MTT NS}$. Pour finir, il convient de noter que les réducteurs directs du MTT ou les réducteurs directs du MTT causant aussi une interférence de couleurs, qui sont retenus dans les tissus après le traitement et dont la capacité de réduction du MTT est telle qu'elle conduit à des DO (pour la mesure de DO) ou à des surfaces de pic (pour la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie) des extraits tissulaires testés situées en-dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre, ne peuvent pas être évalués; ce cas ne se présente a priori que très rarement.
34. La procédure par HPLC/UPLC-spectrophotométrie est utilisable pour mesurer le formazan pour tous les types de produits chimiques (colorés ou non, réducteurs ou non réducteurs du MTT) (36). Étant donné la diversité des équipements de HPLC/UPLC -spectrophotométrie, tous les utilisateurs ne pourront pas reproduire des conditions d'équipement identiques.

Pour cette raison, preuve doit être faite de l'efficacité de l'équipement de HPLC/UPLC -spectrophotométrie avant que celui-ci ne soit utilisé pour quantifier le formazan des extraits tissulaires, en remplissant les critères d'acceptabilité pour un ensemble de paramètres normalisés de qualification inspirés des paramètres décrits dans les recommandations à l'industrie de la *Food and Drug Administration* des États-Unis sur la validation des méthodes de bio-analyse (36)(37). Ces paramètres fondamentaux et leurs critères d'acceptation sont fournis à l'appendice 4. Une fois que les critères d'acceptabilité définis à l'appendice 4 ont été remplis, l'équipement de HPLC/UPLC -spectrophotométrie est considéré comme ayant fait la preuve de son efficacité et prêt pour les mesures du formazan dans les conditions expérimentales décrites dans la présente méthode d'essai.

Critères d'acceptabilité

35. Pour chaque méthode d'essai faisant appel à des lots valables d'épiderme humain reconstitué (voir paragraphe 23), les tissus traités par le témoin négatif (TN) présentent une DO rendant compte de la qualité des tissus ayant été soumis à toutes les étapes d'expédition et de réception ainsi qu'à l'intégralité du protocole. Les valeurs de DO des témoins ne sont pas inférieures aux limites historiques. De la même façon, les résultats obtenus pour les tissus traités par le témoin positif (TP), c'est-à-dire la solution aqueuse de SDS à 5 %, rendent compte de leur capacité à réagir à un produit chimique irritant dans les conditions de la méthode d'essai (voir appendice 3 et pour plus d'information les modes opératoires standardisés des quatre modèles d'essai contenus dans cette méthode d'essai (32) (33) (34) (35). Les mesures associées et appropriées de la variabilité entre les réplicats de tissu (c'est-à-dire les écarts-types doivent normalement se situer dans les limites d'acceptation établies pour le modèle d'essai considéré (voir appendice 3).

Interprétation des résultats et modèle prédictif

36. La valeur de DO obtenue pour chaque produit chimique d'essai peut être utilisée pour calculer le pourcentage de viabilité cellulaire normalisé par rapport au témoin négatif, lequel correspond à une viabilité cellulaire arbitrairement fixée à 100 %. En cas d'utilisation de la procédure de spectrophotométrie HPLC-UPLC, la viabilité cellulaire calculée est le pourcentage de pic de MTT formazan obtenu avec les tissus vivants traités par le produit chimique d'essai par rapport au pic de MTT formazan obtenu avec le témoin négatif testé simultanément. La valeur seuil du pourcentage de viabilité cellulaire, qui établit la distinction entre les produits chimiques irritants et les produits chimiques non classés, de même que les procédures statistiques utilisées pour évaluer les résultats et identifier les produits chimiques irritants, sont clairement définies et étayées par des données. Il conviendra par ailleurs de démontrer leur pertinence (voir les modes opératoires standardisés des modèles d'essai pour information). Les valeurs seuils permettant de prédire les effets irritants sont indiquées ci-dessous:

- Le produit chimique d'essai est identifié comme nécessitant classification et étiquetage selon le SGH de l'ONU/CLP (catégorie 1 ou catégorie 2) si le pourcentage moyen de viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est inférieur ou égal ($\leq$) à 50 %. Puisque les modèles d'essai sur épiderme humain reconstitué compris dans cette méthode d'essai ne sont pas en mesure de différencier les catégories 1 et 2 du SGH de l'ONU/CLP, de plus amples informations sur le potentiel de corrosion de la peau seront requises pour décider sur la classification finale [voir aussi le Document guide IATA (3)]. Dans le cas où le produit chimique d'essai est identifié comme non-corrosif (par exemple sur la méthode d'essai B.40, B.40 *bis* ou B.65), et montre une viabilité cellulaire après traitement, et que l'incubation post-traitement est inférieure ou égale à 50 %, le produit chimique d'essai est considéré comme irritant pour la peau, conformément avec la catégorie 2 du SGH de l'ONU/CLP.
- Selon la réglementation des pays membres, le produit chimique peut-être considéré comme non irritant pour la peau conformément à l'absence de catégorie du SGH de l'ONU/CLP si la viabilité du tissu après exposition et incubation post-traitement est supérieure ($>$) à 50 %.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

37. Pour chaque essai, il convient de présenter, sous forme de tableau, les résultats obtenus pour chaque réplicat de tissu (par exemple, les valeurs de DO et le pourcentage de viabilité cellulaire calculé pour chaque produit chimique d'essai, ainsi que la classification correspondante), y compris les données obtenues, le cas échéant, en reproduisant les expériences. Il conviendra en outre de préciser les valeurs moyennes $\pm$ écart-type correspondant à chaque essai. Les interactions observées avec le réactif MTT et les produits chimiques d'essai colorés seront signalées pour chaque produit chimique d'essai.

Rapport d'essai

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

Produits chimiques d'essai et produits chimiques témoins:

- substance mono-constituant: Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent;
- substance multi-constituants, UVCB ou mélange: Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;

- apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
- source et numéro de lot si disponible;
- traitement du produit chimique d'essai ou du produit chimique témoin avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage);
- stabilité du produit chimique d'essai, date de péremption, ou date de vérification analytique si disponible;
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Modèle d'épiderme humain reconstitué et protocole utilisés; justification de ce choix (le cas échéant)

Conditions de l'essai:

- modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé (y compris numéro de lot);
- informations d'étalonnage de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre), longueur d'onde et passe-bande (s'il y a lieu) utilisés pour quantifier le MTT formazan, et la plage de linéarité de cet appareil de mesure;
- description de la méthode utilisée pour quantifier le MTT formazan;
- description des spécifications du système de spectrophotométrie HPLC/UPLC, s'il y a lieu;
- informations complètes sur le modèle spécifique d'épiderme humain reconstitué utilisé, et notamment sur ses performances, à savoir (liste non limitative);
 - i) viabilité;
 - ii) fonction de barrière;
 - iii) morphologie;
 - iv) reproductibilité et capacité prédictive;
 - v) contrôles de qualité (CQ) du modèle;
- références des données historiques du modèle utilisé, à savoir (liste non limitative) l'acceptabilité des données de contrôle de qualité faisant référence aux données historiques du lot .
- démonstration de la compétence à exécuter la méthode d'essai, avant une utilisation régulière, au moyen des substances d'épreuve de compétence.

Protocole de l'essai:

- description détaillée des procédures appliquées, y compris les procédures de lavage

utilisées après la période d'exposition

- doses de produit chimique d'essai et des produits chimiques témoins;
- durée de la ou des périodes d'exposition et température(s) d'exposition;
- indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques colorés, s'il y a lieu;
- nombre de réplicats de tissus utilisés par produit chimique d'essai et produit chimique témoin [témoin positif, témoin négatif et, le cas échéant, réduction non spécifique du MTT et coloration non spécifique, témoin vivant non spécifique (T_{vivant} NS), témoin mort non spécifique (T_{mort} NS)], par temps d'exposition;
- description des critères de décision/du modèle prédictif appliqués en fonction du modèle d'épiderme humain reconstitué utilisé;
- description de toute modification apportée au protocole d'essai (y compris aux procédures de lavage).

Critères d'acceptabilité de l'épreuve et de l'essai:

- valeur moyenne des témoins positifs et négatifs et plage d'acceptabilité par rapports aux données historiques;
- variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour les témoins positifs et négatifs;
- variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour le produit chimique d'essai.

Résultats:

- présentation des résultats sous forme de tableau, pour chaque produit chimique d'essai et produit chimique témoin, chaque période d'exposition, chaque épreuve et chaque mesure de réplikat, y compris la densité optique ou le pic de MTT formazan, le pourcentage de viabilité cellulaire, le pourcentage moyen de viabilité cellulaire, les différences entre les réplicats, l'erreur standard et/ou le coefficient de variation s'il y a lieu;
- S'il y a lieu, les résultats des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques d'essai colorants, y compris la densité optique ou le pic de MTT formazan, % MTT NS, % T_{vivant} NS, % T_{mort} NS, les différences entre les réplicats de tissus, l'erreur standard et/ou le coefficient de variation s'il y a lieu, et le pourcentage final corrigé de viabilité cellulaire;
- description de tous autres effets observés;
- classification obtenue compte tenu du modèle prédictif/des critères de décision utilisés.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Nations Unies (ONU). (2013). Système Général Harmonisé de Classification et d'Etiquetage des Produits Chimiques (SGH) des Nations Unies, Cinquième Edition Révisée, ONU New York et Genève. Disponible à l'adresse:
[http://www.unece.org/fr/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html].
- (2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the “Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards”, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Available at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf
- (3) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (4) Chapitre B.4 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur la peau
- (5) Chapitre B.40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: Essai de résistance électrique transcutanée (RET).
- (6) Chapitre B.40 *bis* de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: Essai sur modèle de peau humaine.
- (7) Chapitre B.65 de la présente annexe, Méthode d'essai in vitro sur membrane d'étanchéité pour la corrosion cutanée.
- (8) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34) Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A

Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

- (11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.
- (12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.
- (13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.
- (14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinstein, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.
- (15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.
- (16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.
- (17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α .
- (18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.
- (19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonnaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of

Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

- (20) EURL-ECVAM (2007). Déclaration sur la validité des essais in vitro d'irritation cutanée, publiée par le comité consultatif scientifique du l'CEVMA (ESAC26), 27 avril 2007. Disponible à l'adresse: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf
- (21) EURL-ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *N.B. Il s'agit des normes de performances originales utilisées pour la validation de deux méthodes d'essai. Ces normes de performance ne doivent plus être utilisées puisqu'une version mise à jour (8) est désormais disponible..*
- (22) EURL-ECVAM. (2008). Déclaration sur la validité scientifique des essai in vitro d'irritation cutanée, publiée par le comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC29), 5 novembre 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf
- (23) OCDE (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol Sci*, 34, 327-334
- (25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122
- (26) OCDE (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (27) OCDE (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

- (28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.
- (29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.
- (30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403).
- (31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8 ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals
- (33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).
- (34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.
- (35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model “LabCyte EPI-MODEL24”
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in preparation.
- (37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Available at: [<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>].

- (38) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.
- (39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *N.B. Version des normes de performance du CEVMA mise à jour en 2009 en vue de la mise en oeuvre du SGH de l'ONU. Ces normes de performance ne doivent plus être utilisées puisqu'une version mise à jour (8) est désormais disponible pour la présente méthode d'essai.*
- (40) EURL-ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.
- (41) UE (2001). Directive 2001/59/CE de la Commission du 6 août 2001 portant vingt-huitième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses, Journal officiel L 225 de l'Union européenne, p. 1..

Appendice 1

DÉFINITIONS

Précision: 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. Ce terme est souvent utilisé indifféremment à la place de «concordance» pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (9).

Viabilité cellulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire, par exemple la capacité des déshydrogénases mitochondriales cellulaires à réduire le colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium], qui, selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules vivantes.

Produit chimique: désigne une substance ou un mélange.

Concordance: mesure de performance pour les modèles d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories. Elle constitue un des aspects de la pertinence. Ce terme est parfois utilisé indifféremment à la place de «précision», et se définit comme la proportion de tous les produits chimiques d'essai qui ont été correctement classés comme positifs ou négatifs. La concordance dépend étroitement de la prévalence des résultats positifs dans les types de produits chimiques d'essai (9).

TE₅₀: valeur pouvant être estimée en déterminant le temps d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application de la substance marqueur à une concentration fixe spécifiée. Voir également CI₅₀.

SGH [Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (ONU)]: système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

HPLC: Chromatographie Liquide Haute Performance.:

IATA: Approches Intégrées d'Essai et d'Evaluation.

CI₅₀: valeur pouvant être estimée en déterminant la concentration d'une substance marqueur qui réduit la viabilité des tissus de 50 % (CI₅₀) après un temps d'exposition déterminé. Voir également TE₅₀.

Dose infinie: quantité de produit chimique d'essai appliquée sur la peau qui dépasse la

quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface de l'épiderme.

Mélange: désigne un mélange ou une solution composée de deux substances ou plus.

Substance mono-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un des constituants principaux est présent à hauteur d'au moins 80% (m/m).

MTT: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium; bleu de thiazol.

Substance multi-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant figure à une concentration supérieure ou égale à 10% (m/m) and inférieure ou égale à 80% (m/m). Une substance multi-constituant est le résultat d'un processus de manufacture. La différence entre un mélange et une substance multi-constituant est que le mélange est obtenu en mélangeant deux substances ou plus sans que celles-ci réagissent entre elles.. une substance multi-constituant est le résultat d'une réaction chimique.

Témoin T_{mort} NS: témoin de couleur non-spécifique dans les tissus morts.

Témoin T_{vivant} NS: témoin de couleur non-spécifique dans les tissus vivants.

MTT NS: réduction non-spécifique du MTT.

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: (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et (iii) 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 (9).

Témoin positif: réplicat contenant tous les éléments du dispositif d'essai, traité au moyen d'un produit chimique connu pour induire une réponse positive. Afin de s'assurer que la variabilité des réponses du témoin positif peut être évaluée dans le temps, l'intensité de la réponse positive ne doit pas être excessive.

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 (9).

Fiabilité: mesure dans laquelle 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 en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires (9).

Essai substitutif: essai conçu pour remplacer un essai utilisé en routine et accepté, servant à l'identification des dangers et/ou à l'évaluation de risques, et dont il a été démontré qu'il

assure, par rapport à l'essai accepté, une protection équivalente ou accrue de la santé humaine ou animale ou de l'environnement, selon les cas, pour toutes les situations et produits chimiques d'essai possibles (9).

Expérience: une expérience consiste en un ou plusieurs produits chimiques d'essai simultanément avec un témoin négatif et un témoin positif, à l'aide de trois réplicats de tissus identiques.

Sensibilité: proportion des produits chimiques d'essai positifs/actifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (9).

Irritation cutanée in vivo: apparition sur la peau de lésions réversibles à la suite de l'application d'un produit chimique d'essai pendant une durée pouvant aller jusqu'à quatre heures. L'irritation cutanée est une réaction locale du tissu cutané affecté qui se manifeste peu après une stimulation (38). Elle est provoquée par une réaction inflammatoire locale impliquant le système immunitaire inné (non spécifique) du tissu cutané. Elle se caractérise essentiellement par un processus réversible impliquant des réactions inflammatoires et la plupart des signes cliniques caractéristiques de l'irritation (érythème, œdème, démangeaisons et douleur) qui sont associés au processus inflammatoire.

Spécificité: proportion des produits chimiques d'essai négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories, et constitue un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'une méthode d'essai (9).

Substance: 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 affecter sa stabilité ni modifier sa composition.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

UPLC: Chromatographie Liquide Haute Performance

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

Appendice 2

MODÈLES D'ESSAI INCLUS DANS CETTE MÉTHODE D'ESSAI

N°	Nom du modèle d'essai	Type d'étude de validation	Références
1	EpiSkin™	Étude de validation prospective complète (2003-2007). Les éléments de ce modèle ont servi à définir les éléments essentiels des normes de performance du CEVMA originales et actualisées* (39) (40) (21)*. De plus, c'est principalement sur la base des données de cette méthode relatives à l'identification des substances non classées vs classées qu'ont été définies les valeurs de spécificité et de sensibilité des normes de performance originales*.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40)
2	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	EpiDerm™ (version originale): au départ, ce modèle d'essai a été soumis à une étude de validation prospective complète en même temps que la méthode n°1, entre 2003 et 2007. Les éléments de ce modèle ont servi à définir les éléments essentiels des normes de performance du CEVMA, originales et actualisées* (39) (40) (21). EpiDerm™ SIT (EPI-200): une modification du modèle d'origine EpiDerm™ a été validée en 2008 sur la base des normes de performance originales du CEVMA* (21) en 2008.	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40) (2) (21) (22) (23) (33) (2) (21) (22) (23) (31)
3	SkinEthic™ RHE	Étude de validation fondée sur les normes de performance originales du CEVMA* (22) en 2008	(2) (22) (23) (24) (29)
4	LabCyte EPI-MODEL24 SIT	Étude de validation (2011-2012) basée sur les normes de performance de la LD 439 de l'OCDE (8), qui sont fondées sur les normes de performance du CEVMA mises à jour*(39) (40)	(2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40) et normes de performance de la présente LD (8)*

*) Les normes de performance du CEVMA d'origine (21) ont été développées en 2007 à l'issue de l'étude de validation prospective (16) qui avait évalué les performances des modèles d'essai n°1 et 2 sur la base du système de classification de l'UE tel que décrit dans la 28^e modification de la Directive sur les substances dangereuses (41). En 2008 ont été adoptés le système SGH de l'ONU (1) et le CLP de l'UE, qui ont porté de fait la valeur seuil servant à distinguer les substances non classées des substances classées d'un score *in vivo* de 2,0 à 2,3. Pour prendre en compte cette évolution des exigences réglementaires, les valeurs de précision et la liste des produits chimiques de référence des normes de performance du CEVMA ont été mises à jour en 2009 (2) (39) (40). Comme les normes de performance d'origine, les normes de performance actualisées s'appuient largement sur les données issues des modèles n°1 et 2 (17), mais elles utilisent aussi des données sur les produits chimiques de référence tirées du modèle n°3. En 2010, les normes de performance actualisées du CEVMA ont servi à définir les normes de performance relatives à la présente méthode d'essai(8). Dans le cadre de la présente méthode d'essai, EpiSkin™ est considéré comme la MRV, car ce modèle a été utilisé pour définir les critères élaborés dans les normes de performance. Le document explicatif du CEVMA/BfR accompagnant la ligne directrice 439 correspondante de l'OCDE (23) donne des informations détaillées sur les études de validation, présente une compilation des données produites ainsi que des informations contextuelles sur les adaptations à apporter aux normes de performance compte tenu de la mise en œuvre du système SGH de l'ONU/CLP.

SIT: essai d'irritation cutanée (*Skin Irritation Test*)

RHE: épiderme humain reconstitué (*Reconstructed Human Epidermis*)

Appendice 3

PARAMÈTRES DES PROTOCOLES SPÉCIFIQUES À CHAQUE MODÈLE D'ESSAI INCLUS DANS LA PRÉSENTE MÉTHODE D'ESSAI

Les modèles d'épiderme humain reconstitué (RhE) présentent des protocoles très similaires, utilisant notamment toutes une période post-incubation de 42 heures (32) (33) (34) (35). Les variations concernent essentiellement trois paramètres liés aux différentes fonctions de barrière des modèles d'essai, à savoir: A) temps et volume préincubation, B) application des produits chimiques d'essai et C) volume post-incubation.

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI- MODEL24 SIT
A) Préincubation				
Temps d'incubation	18-24 heures	18-24 heures	< 2 heures	15-30 heures
Volume de milieu	2 ml	0,9 ml	3 ou 1 ml	0,5 ml
B) Application du produit chimique				
Pour les liquides	10 µl (26 µl/cm²)	30 µl (47 µl/cm²)	16 µl (32 µl/cm²)	25 µl (83 µl/cm²)
Pour les solides	10 mg (26 mg/cm²) + ED (5 µl)	25 mg (39 mg/cm²) + SSTPD (25µl)	16 mg (32 mg/cm²) + ED (10 µl)	25 mg (83 mg/cm²) + ED (25 µl)
Utilisation de tulle de nylon	pas utilisé	si nécessaire	appliqué	pas utilisé
Temps d'application total	15 minutes	60 minutes	42 minutes	15 minutes
Température d'application	TA	a) à TA pendant 25 minutes b) à 37°C pendant 35 minutes	TA	TA
C) Volume post-incubation				
Volume de milieu	2 ml	0,9 ml x 2	2 ml	1 ml
D) Variabilité maximale acceptable				
Écart-type entre répliquats de tissu	≤ 18	≤ 18	≤ 18	≤ 18

TA: température ambiante

ED: eau distillée

SSTPD: solution saline tamponnée au phosphate de Dulbecco

Appendice 4

PRINCIPAUX PARAMÈTRES ET CRITÈRES D'ACCEPTATION DE LA PREUVE D'EFFICACITÉ D'UN SYSTÈME CLHP/CLUP-SPECTROPHOTOMÉTRIE POUR LA MESURE DU FORMAZAN EXTRAIT D'UN MODÈLE TISSULAIRE D'ÉPIDERME HUMAIN RECONSTRUIT

Paramètre	Protocole dérivé des recommandations de la FDA (29)(31)	Critères d'acceptation
Sélectivité	Analyse de l'isopropanol, du blanc vivant (extrait de modèle tissulaire d'EChR vivant sans traitement dans l'isopropanol), blanc tué (extrait de modèle tissulaire d'EChR tué sans traitement dans l'isopropanol), et d'un colorant (bleu de méthylène, par exemple)	$\text{Surface}_{\text{interférence}} \leq 20 \% \text{ Surface}_{\text{VLIQ}}^1$
Fidélité	Contrôles de qualité (c'est-à-dire, bleu de formazan à 1,6 µg/mL, 16 µg/ml et 160 µg/ml) dans l'isopropanol (n=5)	$\text{CV} \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ pour la VLIQ}$
Justesse	Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	$\% \text{ Écart} \leq 15\% \text{ ou } \leq 20\% \text{ pour la VLIQ}$
Effet de matrice	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=5)	Effet de matrice compris entre 85 % et 115 %
Effet résiduel	Analyse de l'isopropanol après une VLSQ ² normale	$\text{Surface}_{\text{interférence}} \leq 20 \% \text{ Surface}_{\text{VLIQ}}$
Répétabilité (même jour)	3 courbes d'étalonnage indépendantes (établies sur la base de 6 dilutions de formazan au 1/3 consécutives dans l'isopropanol, avec point de départ VLSQ, soit 200 µg/ml); contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	Courbes d'étalonnage: $\% \text{ Écart} \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ pour la VLIQ}$
Reproductibilité (d'un jour à l'autre)	Jour 1: 1 courbe d'étalonnage et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 2: 1 courbe d'étalonnage et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 3: 1 courbe d'étalonnage et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3)	Contrôles de qualité: $\% \text{ Écart} \leq 15 \% \text{ et } \text{CV} \leq 15 \%$
Stabilité à court terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysé le jour de la préparation et après une conservation de 24 heures à température ambiante	$\% \text{ Écart} \leq 15 \%$
Stabilité à long terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR, si nécessaire	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysé le jour de la préparation et après une conservation de plusieurs jours à -20°C	$\% \text{ Écart} \leq 15 \%$

¹VLIQ: valeur limite inférieure de quantification, définie comme correspondant à une viabilité tissulaire de 1-2 %, soit 0,8 µg/ml.

²VLSQ: valeur limite supérieure de quantification, définie comme au moins deux fois la concentration maximale attendue de formazan dans les extraits d'isopropanol issus des témoins négatifs (~70 µg/ml selon la MRV), soit 200 µg/ml.»

(8) Dans la partie B, les chapitres suivants sont ajoutés:

«B.63 ESSAI DE DÉPISTAGE DE LA TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION ET LE DÉVELOPPEMENT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 421 (2016) de l'OCDE. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour pour tenir compte des progrès scientifiques. La ligne directrice 421 originale a été adoptée en 1995, sur la base d'un protocole pour un «essai préliminaire de dépistage de la toxicité pour la reproduction», examiné lors de deux réunions d'experts, à Londres en 1990 (1) et à Tokyo en 1992 (2).
2. La présente méthode d'essai a été mise à jour en y introduisant des paramètres pertinents pour la détection des perturbateurs endocriniens, suite à une activité prioritaire lancée par l'OCDE en 1998, destinée à réviser les lignes directrices existantes et à en élaborer de nouvelles pour les essais et le dépistage des perturbateurs endocriniens (3). La ligne directrice 407 de l'OCDE (Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs, Chapitre B.7 de la présente annexe), par exemple, a été mise à jour en 2008 en y introduisant des paramètres capables de détecter l'activité endocrinienne des produits chimiques d'essai. L'objectif de la mise à jour de la ligne directrice 421 était d'inclure des paramètres pertinents pour l'étude des perturbateurs endocriniens dans des lignes directrices de dépistage au cours desquelles les périodes d'exposition couvrent certaines périodes sensibles du développement (périodes prénatale ou suivant la naissance).
3. Les paramètres pertinents pour la détection des perturbateurs endocriniens qui ont été sélectionnés et ajoutés, font aussi partie de la ligne directrice 443 (Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération, Chapitre B.56 de la présente annexe); ils ont été introduits dans la ligne directrice 421 sur la base d'une étude de faisabilité étudiant les questions scientifiques et techniques liées à l'inclusion de ces paramètres, ainsi que les ajustements possibles à mettre en œuvre dans la conception de l'essai pour permettre leur inclusion (4).
4. La présente méthode d'essai vise l'obtention d'informations sommaires concernant les effets d'un produit chimique d'essai sur le fonctionnement de la reproduction chez le mâle et la femelle, notamment la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition. Elle ne vient pas en remplacement des méthodes d'essai existantes B.31, B.34, B.35 ou B.36.

CONSIDERATIONS PRELIMINAIRES

5. La présente méthode d'essai peut être appliquée en vue d'obtenir une première série d'informations concernant les effets possibles d'une substance sur la reproduction et/ou sur le développement, soit au stade initial d'une évaluation toxicologique soit dans l'évaluation d'une substance particulièrement préoccupante. Elle peut avoir son utilité dans un ensemble d'essais de tri initial de produits chimiques existants pour lesquels les informations toxicologiques sont peu nombreuses ou absentes et peut donner des indications sur l'éventail de doses à utiliser dans des études plus complètes des effets sur la reproduction ou le développement. L'utilisation de cette ligne directrice peut être justifiée dans d'autres cas. Lors de la réalisation de l'étude, il est recommandé de suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (5).
6. Cette méthode d'essai ne permet pas d'obtenir des informations complètes sur tous les aspects de la reproduction et du développement. En particulier, il n'offre qu'un moyen partiel de détecter des manifestations post-natales liées à des expositions prénatales ou des effets éventuellement liés à une exposition post-natale. Étant donné (entre autres raisons) le nombre relativement faible d'animaux dans les groupes, la sélection des effets observés retenue et la brièveté de l'étude, cette méthode ne fournit pas toute l'évidence nécessaire à l'étayage d'une conclusion définitive quant à une absence d'effets. De plus, en l'absence de données tirées d'autres essais de toxicité pour la reproduction et le développement, des résultats positifs sont utiles à une évaluation initiale du danger et permettent de juger de la nécessité de procéder à d'autres essais et de définir le calendrier de ceux-ci.
7. Les résultats obtenus concernant les paramètres endocriniens devraient être interprétés à la lumière du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbant le système endocrinien» (6). La ligne directrice 421 mise à jour fait partie du niveau 4 de ce cadre conceptuel en tant qu'essai *in vivo* apportant des données sur les effets adverses affectant les paramètres endocriniens pertinents. Un signal endocrinien ne sera néanmoins pas toujours considéré comme une preuve suffisante en tant que telle que le produit chimique d'essai est un perturbateur endocrinien.
8. Dans la présente méthode d'essai, le produit chimique d'essai est censé être administré par voie orale. Des modifications peuvent s'avérer indispensables si d'autres voies d'administration sont retenues.
9. Avant d'utiliser la méthode d'essai 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. Les définitions employées figurent dans l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI

11. Le produit chimique d'essai est administré à des doses graduées à plusieurs groupes de mâles et de femelles. Les mâles doivent recevoir le produit chimique pendant un minimum de quatre semaines y compris le jour précédant le sacrifice, soit un minimum de deux semaines avant l'accouplement, pendant la période d'accouplement et environ deux semaines après l'accouplement. Compte tenu de la période limitée d'administration chez les mâles avant l'accouplement, la fertilité n'est pas nécessairement un indicateur précis de la toxicité testiculaire. Il faut donc procéder à un examen histologique détaillé des testicules. Compte tenu de la période d'administration de deux semaines préalable à l'accouplement, suivie d'observations concernant l'accouplement et la fertilité, et du fait que la substance est administrée au total pendant au moins quatre semaines suivies par un examen histopathologique détaillé des gonades mâles, on juge que les conditions sont suffisantes pour permettre de détecter la plupart des effets sur la fertilité mâle et la spermatogénèse.
12. Le produit chimique d'essai doit être administré aux femelles tout au long de l'étude. Celle-ci couvre deux semaines préalables à l'accouplement (de manière à englober au moins deux cycles œstraux complets), la durée variable qui précède la conception, la période de gestation et au moins treize jours après la parturition, y compris le jour précédant celui prévu pour le sacrifice.
13. La durée de l'étude, après acclimatation et évaluation du cycle œstral préalable au traitement, dépend du comportement de la femelle et s'étend sur environ 63 jours (14 jours avant l'accouplement, un maximum de 14 jours pour l'accouplement, 22 jours de gestation, 13 jours de lactation).
14. Pendant la période d'administration, les animaux font l'objet d'une observation quotidienne rigoureuse visant à détecter les signes de toxicité. Les animaux qui périssent ou sont sacrifiés au cours de l'essai sont soumis à une autopsie; à la fin de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Choix des espèces

15. La présente méthode d'essai vise les essais sur le rat. Si les paramètres spécifiés dans la présente méthode d'essai sont examinés chez une autre espèce de rongeur, une justification détaillée sera donnée. Dans le programme international de validation pour la détection des perturbateurs endocriniens de la ligne directrice 407 de l'OCDE (correspondant au chapitre B.7 de la présente annexe), le rat était la seule espèce utilisée. Les souches présentant un faible taux de fécondité ou une fréquence élevée d'anomalies du développement sont à éviter. Il convient d'employer des animaux vierges et sains, sur lesquels aucune expérience n'a été précédemment réalisée. Les animaux soumis à l'essai doivent être caractérisés

comme suit: espèce, souche, sexe, poids et âge. Au début de l'étude, les différences de poids entre les animaux utilisés doivent être minimales et ne pas excéder $\pm 20 \%$ de la moyenne du poids pour chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme ou une étude portant sur une génération complète, il est préférable d'utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

Conditions d'encagement et d'alimentation

16. Toutes les procédures se conformeront aux normes locales en vigueur en matière de protection des animaux de laboratoire. La température de l'animalerie doit être de 22°C (+ 3°C). Idéalement l'humidité relative devrait être comprise entre 50 et 60 %. Elle devrait être au moins égale à 30 % et ne pas dépasser 70 %, sauf lors des opérations de nettoyage du local. Un éclairage artificiel doit être dispensé pour obtenir une photopériode de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. L'alimentation pourra comporter une nourriture classique de laboratoire et de l'eau à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être dicté par la nécessité d'assurer un mélange satisfaisant du produit chimique d'essai lorsque celui-ci est administré par le biais de la nourriture.
17. Les animaux sont encagés par petits groupes d'individus de même sexe; on peut encager les animaux individuellement si une nécessité scientifique le justifie. Dans le cas d'un encagement en groupe, le nombre d'animaux par cage ne doit pas dépasser cinq. L'accouplement doit avoir lieu dans des cages prévues à cet effet. Les femelles gravides doivent être placées dans des cages individuelles et disposer de matériaux nécessaires à la confection des nids. Les femelles allaitantes doivent être hébergées séparément avec leur portée.
18. La nourriture sera analysée régulièrement à la recherche de contaminants. Un échantillon de nourriture sera prélevé jusqu'à la finalisation du rapport.

Préparation des animaux

19. De jeunes adultes sains sont répartis au hasard entre les groupes de contrôle et de traitement. Les cages sont disposées de façon à minimiser les effets possibles dus à leur agencement. Les animaux sont marqués individuellement à des fins d'identification et maintenus dans leurs cages pendant cinq jours au moins avant le démarrage de l'étude afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire.

Préparation des doses

20. Il est recommandé d'administrer le produit chimique d'essai par voie orale sauf si d'autres voies sont jugées plus indiquées. Lorsque l'administration par voie orale est retenue, le produit chimique d'essai est généralement administré par gavage; toutefois, il peut aussi être administré par le biais des aliments ou de l'eau de boisson.

21. Le cas échéant, le produit chimique d'essai est dissout ou mis en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé, dans la mesure du possible, de recourir en priorité à une solution ou à une suspension aqueuse, en second lieu à une solution dans l'huile (huile de maïs, par exemple), ou à défaut dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules, s'ils sont non aqueux, doivent être connues. La stabilité et le caractère homogène du produit chimique d'essai dans le véhicule doivent être déterminés.

MODE OPERATOIRE

Nombre et sexe des animaux

22. Il est recommandé de constituer des groupes d'au moins 10 males et 12-13 femelles. Avant le début de l'exposition, on évaluera les cycles œstraux chez les femelles, et les animaux qui ne présentent pas un cycle classique de 4-5 jours ne seront pas inclus dans l'étude; c'est pourquoi on recommande l'utilisation de femelles supplémentaires, pour parvenir à 10 femelles par groupe. Sauf dans le cas d'effets toxiques marqués, on devrait obtenir au moins 8 femelles gravides par groupe, soit le nombre minimum généralement acceptable. Il s'agit d'aboutir à un nombre suffisant de gestations et à une progéniture suffisamment abondante pour permettre une évaluation fiable de l'action du produit chimique d'essai sur la fertilité, la gravidité, le comportement maternel et l'allaitement, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance F1 à partir de la conception jusqu'au 13ème jour après la parturition.

Détermination des doses

23. En règle générale, on doit disposer d'au moins trois groupes de traitement et d'un groupe témoin. Les niveaux des doses peuvent être déterminés en fonction d'informations tirées d'essais de toxicité aiguë ou de résultats d'études portant sur l'administration de doses répétées. Exception faite de l'administration du produit chimique d'essai, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes soumis à l'essai. Si un véhicule est utilisé pour administrer le produit chimique d'essai, le groupe témoin doit en recevoir le volume administré le plus élevé.
24. La détermination des niveaux des doses doit prendre en compte toutes les données sur la toxicité et les caractéristiques (toxico-)cinétiques disponibles. Il faut aussi prendre en compte le fait que les femelles gestantes et non-gestantes peuvent présenter des sensibilités différentes. La dose la plus élevée doit être choisie de façon à provoquer des effets toxiques mais sans provoquer la mort ou d'importantes souffrances. Ensuite, il convient de déterminer les doses par ordre décroissant pour mettre en évidence toute relation entre traitement et réponse et, au niveau de la dose la plus faible, l'absence d'effets nocifs observés (CSENO). On considère généralement optimal de définir des intervalles d'un facteur deux à quatre, l'intégration d'un quatrième groupe étant souvent jugé préférable à

l'utilisation d'intervalles trop importants (supérieurs à un facteur de 10) entre les niveaux des doses.

25. En cas d'observation d'une toxicité générale (par exemple réduction du poids corporel, effets sur le foie, le cœur, les poumons ou les reins, etc.) ou d'autres modifications susceptibles de ne pas constituer une réponse toxique (par exemple diminution de la prise de nourriture, grossissement du foie), les effets observés sur les paramètres endocriniens devront être interprétés avec précaution.

Épreuve limite

26. Si l'administration orale d'une dose au moins égale à 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ou, en cas d'administration par le biais de l'alimentation ou de l'eau, à un pourcentage équivalent dans la nourriture ou dans l'eau (en fonction du poids corporel), selon les modalités précisées pour cette étude, ne provoque aucun effet toxique observable et si aucune toxicité n'est à prévoir compte tenu des données relatives à des substances présentant une structure voisine, on peut juger qu'il n'est pas nécessaire d'entreprendre une étude complète faisant intervenir plusieurs niveaux de doses. Toutefois, l'exposition humaine prévisible peut conduire à retenir un niveau de dose orale plus élevé pour l'essai limite. Pour d'autres types d'administration, tels que l'inhalation et l'absorption par voie cutanée, les propriétés physico-chimiques des produits chimiques d'essai peuvent souvent dicter la concentration maximale qui peut être mise en œuvre.

Administration des doses

27. Le produit chimique d'essai est administré aux animaux chaque jour de la semaine. En cas de gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique au moyen d'une sonde stomacale ou d'une canule d'intubation adaptée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal soumis à l'essai. Il ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf s'il s'agit d'une solution aqueuse pour laquelle le volume peut atteindre 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite de produits chimiques d'essai irritants ou corrosifs qui feront normalement apparaître des effets d'autant plus marqués que les concentrations seront élevées, la variabilité du volume d'essai devrait être réduite au minimum grâce à un ajustement de la concentration de sorte que le volume soit constant quel que soit le niveau de la dose.
28. En cas d'administration par le biais de l'alimentation ou de l'eau, il importe de veiller à ce que les quantités de produit chimique d'essai utilisées ne perturbent pas l'équilibre normal de la nutrition ou de l'hydratation. Lorsque le produit chimique d'essai est administré par la nourriture, on peut retenir soit une concentration constante dans les aliments (ppm), soit un niveau de dose constant par rapport au poids du corps de l'animal; l'option retenue doit être précisée. En cas d'administration par gavage, la dose doit être apportée quotidiennement à

heures fixes et ajustée au moins une fois par semaine pour être maintenue à un niveau constant par rapport au poids du corps de l'animal.

Calendrier de l'essai

29. L'administration de la substance aux animaux des deux sexes doit commencer au moins deux semaines avant l'accouplement, après une période d'acclimatation d'au moins cinq jours et après avoir observé que les femelles présentaient un cycle œstral normal (au cours d'une période prétraitement de 2 semaines). L'étude doit être programmée de telle sorte que l'accouplement débute peu après que les animaux ont atteint leur pleine maturité sexuelle. Celle-ci intervient à des âges qui varient légèrement selon les espèces et selon les laboratoires, à savoir 10 semaines pour les rats Sprague Dawley et 12 semaines environ pour les rats Wistar. Les femelles ayant mis bas doivent être sacrifiées le 13ème jour qui suit la parturition ou peu après. Le jour de la naissance (où la parturition est achevée) marque le jour 0 de la période post partum. Les femelles qui ne montrent aucun signe de copulation sont sacrifiées 24 à 26 jours après le dernier jour de la période d'accouplement. L'administration de la substance d'essai aux mâles et aux femelles se poursuit durant la période d'accouplement. Au-delà, elle doit continuer pour les mâles, au moins jusqu'à la fin de la période totale d'administration, soit un minimum de 28 jours. Les mâles sont ensuite sacrifiés ou bien maintenus en vie et continuent alors à recevoir la substance d'essai en vue, le cas échéant, d'un second accouplement.
30. L'administration quotidienne du produit chimique d'essai aux femelles de la génération parentale doit continuer pendant toute la gestation et au moins jusqu'au 3ème jour post partum inclus ou jusqu'au jour précédant le sacrifice. En ce qui concerne les études dans lesquelles le produit chimique d'essai est administré par inhalation ou par voie cutanée, l'administration doit se poursuivre au moins jusqu'au 19ème jour inclus de la gestation, et l'administration doit être initiée à nouveau dès que possible et pas après le 4ème jour suivant la naissance.
31. On trouvera une représentation schématique du calendrier d'essai à l'appendice 2.

Modalités d'accouplement

32. On utilise normalement des couples 1:1 (un mâle pour une femelle). Il peut y avoir exception à cette règle si des mâles viennent à mourir. La femelle doit être placée avec le même mâle jusqu'à ce que la copulation soit avérée ou pendant deux semaines. Chaque matin, il convient d'examiner les femelles pour vérifier la présence de sperme ou d'un bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est celui où l'accouplement est avéré (présence de sperme ou d'un bouchon vaginal). Lorsque le couple s'avère improductif, on peut envisager de ré-accoupler les femelles avec des mâles éprouvés du même groupe.

Taille des portées

33. Au quatrième jour après la naissance, on peut ajuster la taille de chaque portée en éliminant des petits surnuméraires choisis au hasard, afin de s'approcher autant que possible du nombre de quatre ou cinq petits par sexe par portée, en fonction de la taille normale d'une portée dans la souche de rats utilisée. Des échantillons de sang seront prélevés sur deux des animaux surnuméraires, mis en commun, et utilisés pour la détermination des niveaux sériques de T4. Il ne convient pas de procéder à une élimination sélective des petits, par exemple basée sur le poids corporel ou la distance ano-génitale (DAG). Lorsque le nombre de petits mâles et femelles est tel qu'il empêche de disposer de quatre ou cinq animaux de chaque sexe par portée, il est acceptable de procéder à des ajustements partiels (par exemple, six mâles et quatre femelles). Aucun petit ne sera éliminé quand la taille de la portée devient inférieure à la limite d'ajustement de 8 à 10 petits/portée. S'il n'existe qu'un petit surnuméraire au-dessus de la limite d'ajustement, alors ce seul petit surnuméraire sera éliminé et un échantillon de sang prélevé afin de déterminer le niveau sérique de T4.
34. Si la taille des portées n'est pas ajustée, deux petits par portée seront sacrifiés au 4^e jour après la naissance et des échantillons de sang seront prélevés pour la mesure des concentrations sériques d'hormones thyroïdiennes. Si possible, les deux petits par portée seront des femelles afin de réserver les mâles pour l'examen de la persistance du mamelon, exception faite du cas où l'élimination de ces petits ne laisse aucune femelle pour les évaluations terminales. Aucun petit ne sera éliminé quand la taille de la portée devient inférieure à la limite d'ajustement de 8 à 10 petits/portée (en fonction de la taille normale d'une portée chez la souche de rats employée). S'il n'existe qu'un petit surnuméraire au-dessus de la limite d'ajustement, alors ce seul petit surnuméraire sera éliminé et un échantillon de sang prélevé afin de déterminer la concentration sérique de T4.

Observations *In vivo*

Observations cliniques

35. Tout au long de la période d'essai, chaque animal doit être soumis à des observations cliniques au moins une fois par jour, et plus fréquemment lorsque des signes de toxicité sont observés. Il est préférable de faire ces observations au(x) même(s) moment(s) de la journée en tenant compte des périodes culminantes au cours desquelles les effets attendus se manifestent après administration de la substance. Les changements de comportement dignes d'intérêt, ainsi que les signes de parturition difficile ou prolongée, de même que tous les signes de toxicité, mortalité comprise, doivent être consignés. Il convient de préciser le moment de déclenchement, le degré et la durée des signes de toxicité.

Poids corporel et consommation d'aliments et d'eau

36. Les mâles et les femelles doivent être pesés le premier jour d'administration de la substance d'essai, puis au moins une fois par semaine, ainsi que le dernier jour. Au cours de la gestation, les femelles doivent être pesées les jours 0, 7, 14 et 20, et dans les 24

heures qui suivent la parturition (jour 0 ou 1 post partum), ainsi que les 4^{ème} jour et 13^{ème} jour post partum. Ces observations sont à enregistrer de manière individuelle pour chaque animal adulte.

37. Durant les périodes de pré-accouplement, de gestation et de lactation, la consommation alimentaire doit être mesurée au moins une fois par semaine. Cette mesure est facultative pendant la période d'accouplement. La consommation d'eau doit également être mesurée durant les périodes en question lorsque le produit chimique d'essai est administré par l'eau de boisson.

Cycle œstral

38. Les cycles œstraux sont contrôlés avant le début du traitement pour sélectionner pour l'étude des femelles présentant un cycle régulier (voir paragraphe 22). Les frottis vaginaux sont examinés chaque jour depuis le début du traitement jusqu'à la confirmation de l'accouplement. Si l'on suspecte que des effets liés à un stress aigu lors de l'initiation du traitement pourraient perturber le cycle œstral, les laboratoires peuvent exposer les animaux de l'essai pendant deux semaines, puis effectuer des frottis vaginaux chaque jour pour contrôler le cycle œstral pendant un minimum de deux semaines débutant au début de la période de pré-accouplement et se poursuivant durant la période d'accouplement, jusqu'à ce que l'accouplement soit avéré. Pour obtenir des cellules vaginales ou cervicales, on prendra soin d'éviter d'agresser la muqueuse ce qui risquerait d'induire une pseudo-gestation (7) (8).

Caractéristiques de la descendance

39. La durée de la gestation doit être notée et calculée à partir du jour 0. Il importe d'examiner chaque portée dès que possible après la parturition de manière à déterminer le nombre et le sexe des petits, le nombre de morts-nés, de petits vivants et d'avortons (petits de taille sensiblement inférieure à celle des petits témoins), ainsi que les anomalies évidentes.
40. Dans les 24 heures qui suivent la parturition (jours 0 ou 1 post partum) et au moins aux jours 4 et 13 post partum, il faut compter les petits vivants et déterminer leur sexe et également peser les portées. En plus des observations (décrites au paragraphe 35), il faut consigner tout comportement anormal de la descendance.
41. On mesure la DAG de chaque petit au même jour suivant la naissance, entre les JPN 0 et 4. Le poids corporel des petits est relevé le jour de la mesure de la DAG; la DAG est rapportée à une mesure de la taille du petit, de préférence la racine cubique du poids corporel (9). On devra compter le nombre de mamelons/aréoles chez les petits mâles aux JPN 12 ou 13, comme le document d'orientation 151 de l'OCDE le recommande (10).

Biochimie clinique

42. Des échantillons sanguins sont prélevés sur un site défini selon le schéma suivant:

- chez au moins deux petits par portée au jour 4 après la naissance, si le nombre de petits le permet (voir paragraphes 40-41);
- chez toutes les mères et chez au moins deux petits par portée à la fin de l'expérience au jour 13, et
- chez les adultes mâles à la fin de l'expérience.

Tous ces échantillons sont conservés dans des conditions appropriées. Les échantillons de sang des petits à JPN13 et des adultes mâles font l'objet d'un dosage sérique d'hormones thyroïdiennes (T4). D'autres évaluations de T4 dans les échantillons de sang des mères et des petits à JPN 4 peuvent être réalisées, le cas échéant. De manière optionnelle on pourra mesurer d'autres hormones, le cas échéant. Le sang des petits peut être mis en commun par portée pour l'analyse des hormones thyroïdiennes. Les hormones thyroïdiennes (T4 et TSH) seront de préférence mesurées sous forme 'totale'.

43. Les facteurs suivants peuvent influencer la variabilité et les concentrations absolues des déterminations hormonales:

- le moment du sacrifice, à cause des variations diurnes des concentrations hormonales,
- la méthode de sacrifice, qui devra éviter un stress inutile chez les animaux pouvant affecter les concentrations en hormones thyroïdiennes,
- les kits d'essai pour les déterminations hormonales, dont les courbes standards peuvent différer d'un kit à l'autre.

44. Les échantillons de plasma spécifiquement destinés à la détermination des hormones doivent être obtenus à des moments de la journée comparables. Les valeurs numériques obtenues lors de l'analyse des concentrations hormonales diffèrent en fonction du kit commercial utilisé.

Pathologie

Autopsie générale

45. Lors du sacrifice ou en cas de mort survenue au cours de l'étude, les animaux adultes doivent faire l'objet d'un examen macroscopique visant à mettre en évidence d'éventuelles anomalies ou modifications pathologiques. On s'intéressera plus particulièrement aux organes de l'appareil reproducteur. Le nombre de sites d'implantation d'embryons doit être consigné. Les frottis vaginaux sont examinés le matin du jour de la nécropsie pour déterminer quelle est la phase du cycle œstral et permettre une corrélation avec l'histopathologie des ovaires.

46. Les testicules et épидидymes de même que la prostate et les vésicules séminales avec les glandes de coagulation entières de tous les animaux mâles adultes devront être débarrassés de tout tissu adhérent si nécessaire, et leur poids mesuré aussitôt après la dissection pour éviter toute déshydratation. En outre, il est possible de relever le poids d'autres organes,

tels que le complexe des muscles élévateur de l'anوس et bulbo-caverneux, les glandes de Cowper et le gland du pénis chez les mâles, et les ovaires et l'utérus (y compris le col) chez les femelles. Le cas échéant, les mesures doivent être effectuées aussitôt que possible après la dissection

47. Les petits morts ainsi que ceux qui sont sacrifiés au 13^{ème} jour post partum, ou peu après, doivent être au moins soumis à un examen externe rigoureux visant à déterminer d'éventuelles anomalies flagrantes. Une attention particulière devra être apportée aux organes génitaux reproducteurs externes, pour lesquels on recherchera des signes de modification de leur développement. Le 13^{ème} jour, il faudra conserver la thyroïde d'un petit mâle et d'un petit femelle par portée.
48. Les ovaires, testicules, organes sexuels secondaires (utérus et glaire cervicale, épидидymes, prostate, vésicule séminale plus glande coagulantes), thyroïde, ainsi que l'ensemble des organes présentant des lésions macroscopiques de tous les animaux adultes doivent être conservés. La fixation à la formaline n'est pas recommandée pour l'examen de routine des testicules et épидидymes. L'emploi du fixateur de Bouin ou du liquide de Davidson modifié est acceptable pour ces tissus (11). La tunique albuginée peut être perforée en douceur et de façon superficielle aux deux pôles de l'organe avec une aiguille permettant une pénétration rapide du liquide de fixation.

Histopathologie

49. Il convient de procéder à un examen histologique précis des ovaires, testicules et épидидymes (en accordant une attention particulière aux étapes de la spermatogénèse et à l'histopathologie de la structure des cellules interstitielles des testicules) chez les animaux du groupe ayant reçu les doses les plus élevées et ceux du groupe témoin. Les autres organes conservés, incluant la thyroïde des petits et des animaux adultes, peuvent être examinés s'il y a lieu. Le poids de la thyroïde peut être déterminé après la fixation. L'élimination des tissus adhérents doit également s'opérer avec beaucoup de soin et seulement après la fixation pour éviter d'abîmer les tissus, et par là de compromettre l'analyse d'histopathologie. L'examen doit s'étendre aux animaux des groupes ayant reçu des doses différentes lorsque des modifications sont observées dans le groupe auquel ont été administrées les doses les plus élevées. Le document d'orientation sur l'histopathologie (11) donne plus de détails sur la dissection, la fixation, la section et l'histopathologie des tissus endocriniens.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

50. Des données individuelles sont à fournir pour chaque animal. Elles doivent en outre être présentées sous la forme d'un tableau indiquant pour chaque groupe étudié le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux morts au cours de l'essai ou

euthanasiés, ainsi que le moment de la mort ou de l'euthanasie, le nombre d'animaux fertiles, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, une description des signes de toxicité observés, comprenant le moment du déclenchement, la durée et la gravité des effets toxiques éventuels, les types de modifications histopathologiques, ainsi que toutes les informations dignes d'intérêt concernant les portées. On trouvera à l'appendice 3 un modèle de rapport succinct sous forme de tableau qui s'avère très utile pour l'évaluation des effets sur la reproduction et le développement.

51. Compte tenu de la portée restreinte de l'étude, l'analyse statistique visant à vérifier le caractère significatif des résultats n'a qu'une valeur limitée pour de nombreux effets observés, notamment les effets sur la reproduction. Si une analyse statistique est réalisée, la méthode retenue doit convenir à la distribution de la variable examinée et doit être arrêtée préalablement à la mise en route de l'étude. S'il y a lieu, l'unité d'analyse sera la portée. L'analyse statistique de la DAG et de persistance du mamelon doit être basée sur les données individuelles des petits, en prenant en compte les effets sur la portée. L'analyse statistique du poids corporel des petits doit être basée sur les données individuelles des petits, en prenant en compte la taille de la portée. Étant donné la petite taille des groupes, il peut être utile de se référer à d'éventuelles données obtenues dans des études antérieures (taille des portées, par exemple) pour faciliter l'interprétation de l'étude.

Évaluation des résultats

52. Les résultats de cette étude sur la toxicité doivent être évalués en fonction des effets observés, de l'autopsie et des données microscopiques. L'évaluation portera notamment sur le lien entre, d'une part, la dose du produit chimique d'essai et, d'autre part, la présence ou l'absence, l'incidence et la gravité des anomalies, y compris les lésions grossières, les organes cibles désignés, l'infertilité, les anomalies cliniques, l'action sur la reproduction et les portées, les modifications du poids corporel, les effets sur la mortalité et tout autre effet toxique.
53. La période de traitement du mâle étant de courte durée, l'histopathologie des testicules et des épидидymes doit aller de pair avec les données sur la fertilité dans le cadre de l'évaluation des effets sur la reproduction chez le mâle. L'utilisation des données des témoins historiques pour la reproduction/développement (par exemple pour la taille des portées, DAG, persistance du mamelon, taux sériques de T4), pourrait, le cas échéant, s'avérer être une aide utile pour l'interprétation des données.
54. Pour le contrôle de la qualité, il est proposé que les données des témoins historiques soient collectées et que les coefficients de variation soient calculés dans le cas de données numériques, tout particulièrement pour les paramètres en lien avec la détection de perturbateurs endocriniens. Ces données peuvent être utilisées à des fins de comparaison quand les études sont évaluées.

Rapport

55. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation si c'est disponible;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue.

Substance mono-constituant:

- apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;
- 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:

- caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Véhicule (s'il y a lieu):

- raisons justifiant le choix du véhicule lorsqu'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux soumis à l'essai:

- espèce et souche;
- nombre, sexe et âge des animaux;
- origine, conditions d'encagement, type d'alimentation, etc.;
- poids de chaque animal au début de l'essai;
- justification de l'espèce si l'espèce choisie n'est pas le rat.

Conditions de l'essai:

- critères de choix des niveaux de doses;
- précisions concernant la formulation du produit chimique d'essai et de la préparation de l'alimentation, les concentrations obtenues, la stabilité et l'homogénéité de la préparation;
- description détaillée de l'administration du produit chimique d'essai;
- conversion de la concentration du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau (ppm) en dose effective (mg/kg de poids corporel/jour), le cas échéant;
- précisions concernant la qualité des aliments et de l'eau;

- description détaillée des protocoles de randomisation utilisés pour sélectionner les petits éliminés de la portée, s'il y a eu élimination.

Results:

- modifications du poids corporel;
- données relatives à la consommation d'aliments et d'eau (si elles sont disponibles);
- données sur les effets toxiques provoqués en fonction du sexe et de la dose, concernant notamment la fertilité, la gestation et tout autre signe de toxicité;
- durée de la gestation;
- effets toxiques ou autres sur la reproduction, la progéniture, la croissance post-natale, etc.;
- nature, gravité et durée des manifestations cliniques observées (réversibles ou non);
- nombre de femelles adultes présentant un cycle œstral normal ou anormal et durée du cycle;
- nombre de petits vivants à la naissance et pertes après implantation;
- données relatives au poids corporel des petits;
- DAG de tous les petits (et poids corporel le jour de la mesure de la DAG);
- persistance du mamelon chez les petits mâles;
- taux d'hormones thyroïdiennes chez les petits âgés de 13 jours et les mâles adultes (ainsi que chez les mères et chez les petits âgés de 4 jours si cela a été mesuré);
- nombre de petits présentant des anomalies évidentes, évaluation macroscopique des organes génitaux externes, nombre d'avortons;
- indication du moment de la mort survenue pendant l'étude, ou si l'animal a survécu jusqu'à la fin;
- nombre d'embryons implantés, taille et poids des portées au moment de la consignation de ces données;
- poids corporel lors du sacrifice et poids des organes des animaux de la génération parentale;
- résultats de l'autopsie;
- description détaillée de l'examen histopathologique;
- données sur l'absorption (si elles sont disponibles);
- traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Examen des résultats.

Conclusions.

Interprétation des résultats

56. L'étude permettra d'évaluer la toxicité pour la reproduction et le développement liée à l'administration de doses répétées (voir paragraphes 5 et 6). Elle pourrait aider à déterminer s'il y a lieu d'approfondir les recherches et fournir des orientations pour la conception d'études ultérieures. Le document d'orientation n° 43 de l'OCDE devra être consulté pour aider à l'interprétation des résultats liés à la reproduction et au développement (12). Le document d'orientation n° 106 de l'OCDE sur l'évaluation histologique des essais endocriniens et de reproduction chez les rongeurs (11) fournit des informations sur la préparation et l'évaluation des organes (endocriniens) et des frottis vaginaux; ces informations peuvent être utiles dans le cadre de la présente ligne directrice.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponible sur demande auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponible sur demande auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (3) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Disponible sur demande auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (4) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 217), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (5) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (N° 19), Organisation de coopération et de développement économiques, .Paris.
- (6) OCDE (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 150), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.
- (8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.
- (9) Gallavan R.H. Jr , Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L.(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

- (10) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 151), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (11) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 106), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (12) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 43), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

Appendice 1

DEFINITIONS (voir aussi le document d'orientation n° 150 de l'OCDE(6))

Androgénicité: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un organisme mammifère.

Antiandrogénicité: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un organisme mammifère.

Antioestrogénicité: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone oestrogénique naturelle (par exemple le 17 β -oestradiol) chez un organisme mammifère.

Activité antithyroïdienne: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple T₃) chez un organisme mammifère.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Toxicité pour le développement: prolongement de la toxicité pour la reproduction, qui se traduit pour la progéniture par des perturbations prénatales, périnatales, post-natales, structurelles ou fonctionnelles.

Détermination des doses: notion générale englobant la dose, ainsi que la fréquence et la durée d'administration.

Dose: quantité de produit chimique d'essai administrée, exprimée en poids (g, mg) ou en poids par unité de poids de l'animal soumis à l'essai (mg/kg, par exemple), ou encore en concentration dans l'aliment (ppm).

Toxicité évidente: notion générale qui renvoie aux signes incontestables de toxicité consécutifs à l'administration de la substance d'essai. Ceux-ci doivent être suffisants pour permettre d'évaluer le danger et se manifester de telle manière qu'une augmentation de la dose administrée se traduira selon toute vraisemblance par l'apparition de signes de grave toxicité conduisant probablement à la mort.

Altération de la fertilité: perturbation des fonctions ou de la capacité de reproduction chez le mâle ou chez la femelle..

Toxicité pour la femelle gravide: effets défavorables sur la femelle gravide, spécifiques (effets directs) ou non (effets indirects).

CSENO: concentration sans effet nocif observé. C'est la dose la plus élevée pour laquelle on n'observe aucun effet dommageable lié au traitement.

Oestrogénicité: c'est la capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone naturelle oestrogénique (par exemple le 17 β -oestradiol) chez un organisme mammifère.

Toxicité pour la reproduction: effets préjudiciables sur la progéniture ou altération des fonctions ou de la capacité de reproduction chez le mâle et chez la femelle.

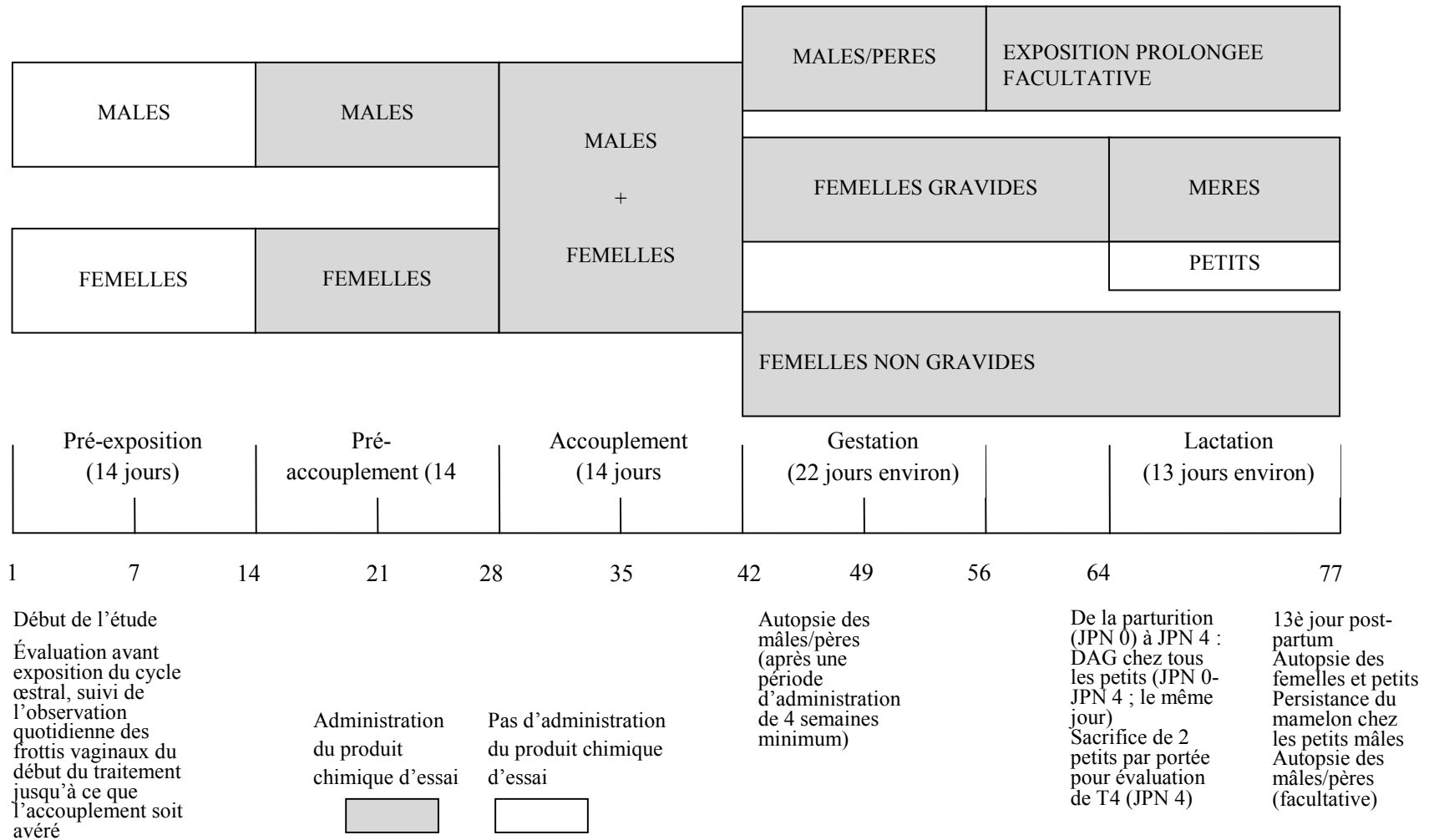
Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Activité thyroïdienne: c'est la capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple T₃) chez un organisme mammifère.

Validation: processus scientifique visant à caractériser les exigences opératoires et les limites d'une méthode de test et à en démontrer la fiabilité et la pertinence pour un objectif particulier.

Appendice 2

REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU PROGRAMME D'ESSAI INDIQUANT LA DURÉE MAXIMALE DE L'ÉTUDE, POUR UNE PÉRIODE D'ACCOUPLEMENT COMPLÈTE DE 14 JOURS



Appendice 3

TABLEAU RECAPITULATIF DES EFFETS SUR LA REPRODUCTION ET LE DEVELOPPEMENT

OBSERVATIONS	VALEURS				
Dosage (unités)	0 (témoin)	.. .	.. .	.. .	.. .
Cycle œstral (au moins durée moyenne et fréquence de cycles irréguliers)					
Femelles présentant signes d'accouplement (N)					
Femelles gravides (N)					
Jours conception 1-5 (N)					
Jours conception 6- . . ⁽¹⁾ (N)					
Gestation ≤ 21 jours (N)					
Gestation = 22 jours (N)					
Gestation ≥ 23 jours (N)					
Mères ayant mis bas petits vivants (N)					
Mères ayant petits vivants au 4ème jour post partum (N)					
Embryons implantés/mère (moyenne)					
Petits vivants/mère à la naissance (moyenne)					
Petits vivants/mère au 4ème jour post partum (moyenne)					

⁽¹⁾ dernier jour de la période d'accouplement

Rapport mâles/femelles à la naissance (moyenne)					
Rapport mâles/femelles au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des portées à la naissance (moyenne)					
Poids des portées au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des petits à la naissance (moyenne)					
Poids des petits au moment de la mesure de la DAG (moyenne des mâles, moyenne des femelles)					
DAG des petits mesurée le même jour post natal, entre la naissance et JPN 4 (moyenne des mâles, moyenne des femelles, noter le JPN)					
Poids des petits au 4ème jour post partum (moyenne)					
Persistance du mamelon chez les petits mâles au jour 13 post partum (moyenne)					
Poids des petits au 13ème jour post partum (moyenne)					
PETITS PRÉSENTANT DES ANOMALIES					
Mères affectées par 0					
Mères affectées par 1					
Mères affectées par ≥ 2					
PERTES DE DESCENDANCE					
Pertes prénatales/après implantation (embryons implantés moins petits vivants à la naissance)					
Femelles affectées par 0					
Femelles affectées par 1					
Femelles affectées par 2					
Femelles affectées par ≥ 3					
Pertes post-natales (Petits vivants à la naissance moins petits vivants au 13ème jour post partum)					
Femelles affectées par 0					
Femelles affectées par 1					

Femelles affectées par 2					
Femelles affectées par ≥ 3					
Cycle œstral (au moins durée moyenne et fréquence de cycles irréguliers)					

B.64 ÉTUDE COMBINÉE DE TOXICITÉ À DOSES RÉPÉTÉES ET DE DÉPISTAGE DE LA TOXICITÉ POUR LA REPRODUCTION ET LE DÉVELOPPEMENT

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 422 de l'OCDE. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour pour tenir compte des progrès scientifiques. La ligne directrice 422 originale a été adoptée en 1996, sur la base d'un protocole pour une «étude combinée de toxicité à doses répétées et de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement», examiné lors de deux réunions d'experts, à Londres en 1990 (1) et à Tokyo en 1992 (2).
2. La présente méthode d'essai comporte une partie relative au dépistage de la toxicité pour la reproduction et/ou le développement fondée sur l'expérience acquise dans les pays Membres par l'application de la méthode initiale à des produits chimiques existants produits en grande quantité et par la réalisation d'essais d'orientation avec des témoins positifs (3) (4). Elle comprend également une partie relative à la toxicité à doses répétées, conforme à la ligne directrice 407 (Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs, correspondant au chapitre B.7 de la présente annexe).
3. La présente méthode d'essai a été mise à jour en y introduisant des paramètres pertinents pour la détection des perturbateurs endocriniens, suite à une activité prioritaire lancée par l'OCDE en 1998, destinée à réviser les lignes directrices existantes et à en élaborer de nouvelles pour les essais et le dépistage des perturbateurs endocriniens (5). Dans ce contexte, la ligne directrice 407 (Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs, correspondant au chapitre B.7 de la présente annexe), a été mise à jour en 2008 en y introduisant des paramètres capables de détecter l'activité endocrinienne des produits chimiques d'essai. L'objectif de la mise à jour de la ligne directrice 422 était d'inclure des paramètres pertinents pour l'étude des perturbateurs endocriniens dans des lignes directrices de dépistage au cours desquelles les périodes d'exposition couvrent certaines périodes sensibles du développement (périodes prénatale ou suivant la naissance).
4. Les paramètres pertinents pour la détection des perturbateurs endocriniens qui ont été sélectionnés et ajoutés, font aussi partie de la ligne directrice 443 (Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération, correspondant au chapitre B.56 de la présente annexe); ils ont été introduits dans la ligne directrice 422 sur la base d'une étude de faisabilité étudiant les questions scientifiques et techniques liées à l'inclusion de ces paramètres, ainsi que les ajustements possibles à mettre en œuvre dans la conception de l'essai pour permettre leur inclusion (6).

5. La présente méthode d'essai vise l'obtention d'informations sommaires concernant les effets d'un produit chimique d'essai sur le fonctionnement de la reproduction chez le mâle et la femelle, notamment la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition. Elle ne vient pas en remplacement des méthodes d'essai existantes B.31, B.34, B.35 ou B.36.

CONSIDERATIONS PRELIMINAIRES

6. Lors de l'évaluation et de l'estimation des propriétés toxiques d'un produit chimique d'essai, on peut déterminer la toxicité orale à doses répétées après avoir obtenu une indication sur la toxicité au moyen d'essais de toxicité aiguë. On trouvera dans la présente étude des informations relatives aux dangers possibles pour la santé, découlant d'expositions répétées pendant une période relativement limitée. La méthode comprend l'étude de base de toxicité à doses répétées applicable aux produits chimiques pour lesquels une étude à 90 jours ne se justifie pas (par exemple lorsque le volume de la production ne dépasse pas une certaine limite) ou lorsqu'elle constitue une étude préliminaire à une étude à long terme. Lors de la réalisation de l'étude, il est recommandé de suivre les principes et considérations énoncés dans le document d'orientation n° 19 de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques en tant qu'effets mesurés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées à des fins d'évaluation de la sécurité (7).
7. L'étude comprend en outre un test de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement et elle peut donc être utilisée pour obtenir des informations initiales sur les effets possibles affectant les capacités reproductrices du mâle et de la femelle telles que la fonction gonadique, le comportement lors de l'accouplement, la conception, le développement de l'embryon et la parturition, soit à un stade précoce de l'évaluation des propriétés toxicologiques des substances chimiques, soit sur des substances chimiques préoccupantes. Cette méthode d'essai ne fournit pas une information exhaustive sur tous les aspects de la reproduction et du développement. En particulier, elle n'offre que des moyens limités pour déceler des manifestations postnatales d'une exposition prénatale ou des effets imputables à une exposition postnatale. En raison (entre autres) du choix des effets observés retenus et de la brièveté de l'étude, cette méthode ne fournit pas toute l'évidence nécessaire à l'étayage d'une conclusion définitive quant à une absence d'effets toxiques pour la reproduction et le développement. De plus, en l'absence de données tirées d'autres essais de toxicité pour la reproduction et le développement, des résultats positifs sont utiles à une évaluation initiale du danger et permettent de juger de la nécessité de procéder à d'autres essais et de définir le calendrier de ceux-ci.

8. Les résultats obtenus concernant les paramètres endocriniens devraient être interprétés à la lumière du «Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbant le système endocrinien» (8). La ligne directrice 422 de l'OCDE mise à jour fait partie du niveau 4 de ce Cadre conceptuel en tant qu'essai *in vivo* apportant des données sur les effets adverses affectant les paramètres endocriniens pertinents. Un signal endocrinien ne sera néanmoins pas toujours considéré comme une preuve suffisante en tant que telle que le produit chimique d'essai est un perturbateur endocrinien.
9. Cette méthode d'essai met également l'accent sur la recherche d'éventuels effets neurologiques et elle insiste sur la nécessité de soumettre les animaux à des observations cliniques minutieuses afin de recueillir le maximum d'observations. La méthode devrait permettre de déceler des produits chimiques présentant des risques de neurotoxicité et pour lesquels des études plus approfondies dans cette voie seraient justifiées. En outre, la méthode peut aussi donner des indications relatives à l'immunotoxicité.
10. En l'absence de données résultant d'autres études de toxicité systémique, de toxicité pour la reproduction et le développement, de neurotoxicité et/ou d'immunotoxicité, des résultats positifs permettent de faire une évaluation préliminaire des dangers et d'orienter les décisions quant à la nécessité d'effectuer et de programmer des essais supplémentaires. Ce test peut être particulièrement utile dans le dossier OCDE d'Examen détaillé des données (EDD) des substances existantes, celles pour lesquelles on dispose de peu ou pas de données toxicologiques, où il peut être utilisé comme une alternative à la conduite de deux tests séparés, respectivement pour la toxicité à dose répétée (ligne directrice 407 de l'OCDE, correspondant au chapitre B.7 de la présente annexe) et pour la toxicité pour la reproduction et le développement (ligne directrice 421 de l'OCDE, correspondant au chapitre B.63 de la présente annexe). Il peut être aussi utilisé pour sélectionner la gamme des doses en vue d'études sur la reproduction et le développement plus extensives, ou dans les cas où cela est jugé pertinent.
11. Il est généralement admis qu'il existe des différences de sensibilité entre les femelles gravides et celles qui ne le sont pas. En conséquence, il peut s'avérer plus difficile de déterminer les niveaux de dose appropriés qui permettent l'évaluation de la toxicité systémique générale et de la toxicité particulière pour la reproduction et le développement dans cet essai combiné que lorsque des essais distincts sont menés séparément. De plus, du fait de la complexité technique de l'essai, la réalisation de cet essai de dépistage combiné peut dépasser les compétences de laboratoires inexpérimentés. Cependant, outre le plus petit nombre d'animaux implique l'essai combiné peut être un meilleur moyen de distinguer les effets directs sur la reproduction et le développement de ceux, secondaires à d'autres effets (systémiques).

12. Dans le présent essai, la période d'administration des doses est plus longue que dans l'étude classique de toxicité à doses répétées sur 28 jours. En revanche, elle utilise moins d'animaux de chaque sexe par groupe par rapport au nombre d'animaux utilisés dans l'exécution d'une étude classique à doses répétées sur 28 jours qui serait faite à la suite d'un essai de dépistage de toxicité pour la reproduction et le développement.
13. La présente méthode d'essai postule que le produit chimique d'essai est administré par voie orale. Des modifications peuvent être nécessaires si d'autres voies d'exposition sont utilisées.
14. Avant d'utiliser la méthode d'essai 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.
15. On trouvera à l'appendice 1 les définitions des termes utilisés.

PRINCIPE DE L'ESSAI

16. Le produit chimique d'essai est administré en doses successives à plusieurs groupes de mâles et de femelles. L'administration aux mâles devrait s'étendre sur une période d'au moins quatre semaines jusque, et y compris, le jour précédant le sacrifice programmé de l'animal (cette période de quatre semaines couvre une période minimale de deux semaines avant et au cours de la période d'accouplement et une période approximative de deux semaines après l'accouplement). En ce qui concerne les mâles, étant donné la brièveté de l'administration avant l'accouplement, la fécondité pourrait ne pas être un indicateur particulièrement sensible de la toxicité testiculaire. En conséquence, il est indispensable de procéder à un examen histologique détaillé des testicules. On considère que la combinaison de l'administration des doses pendant deux semaines avant l'accouplement et des observations subséquentes sur l'accouplement et la fécondité (portant à quatre semaines minimum la période totale d'administration des doses), complétée par l'analyse histopathologique approfondie des gonades mâles, permet la détection de la plupart des effets sur la fécondité masculine et sur la spermatogenèse.
17. Les doses doivent être administrées aux femelles pendant toute la durée de l'étude, c'est-à-dire deux semaines avant l'accouplement (visant à couvrir au moins deux cycles menstruels complets), plus le temps variable qui peut s'écouler jusqu'à la conception, la durée de la gestation et au moins treize jours après la parturition, jusque et y compris le jour précédant le sacrifice de l'animal.

18. La durée de l'étude, après l'acclimatation des animaux et évaluation du cycle œstral préalable au traitement, dépend du comportement des femelles mais couvre environ 63 jours, [14 jours avant l'accouplement, la période d'accouplement (qui peut atteindre 14 jours), 22 jours de gestation et 13 jours de lactation].
19. Au cours de la période d'administration des doses, les animaux sont soigneusement observés à un rythme quotidien pour déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont sacrifiés au cours de l'essai sont autopsiés, et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont sacrifiés et autopsiés.

DESCRIPTION DE LA METHODE

Choix des espèces

20. La présente méthode d'essai est conçue pour être appliquée au rat. Si les paramètres spécifiés dans la présente ligne directrice 422 sont examinés chez une autre espèce de rongeur, une justification détaillée sera donnée. Dans le programme international de validation pour la détection des perturbateurs endocriniens pour la ligne directrice 407, le rat était la seule espèce utilisée. Il convient d'éviter l'utilisation de souches de faible fécondité ou dont on sait qu'elles sont souvent affectées de défauts de développement. Il faut utiliser des animaux sains et vierges, qui n'ont jamais fait l'objet d'essais antérieurs. Les animaux d'essai doivent être caractérisés par leur espèce, leur souche, leur sexe, leur poids et leur âge. Au début de l'étude, la variation de poids des animaux utilisés devrait être minimale et ne pas dépasser $\pm 20\%$ du poids moyen pour chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme ou une étude portant sur une génération complète, il est préférable d'utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

Conditions d'encagement et d'alimentation

21. Toutes les procédures se conformeront aux normes locales en vigueur en matière de protection des animaux de laboratoire. La température dans la salle des animaux doit être maintenue à 22°C ($\pm 3^\circ$). L'humidité relative doit être maintenue à 30 pour cent au moins et ne doit pas dépasser 70 pour cent, sauf durant le nettoyage de la salle. Un éclairage artificiel doit être dispensé pour obtenir une photopériode de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. L'alimentation pourra comporter une nourriture classique de laboratoire et de l'eau à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être dicté par la nécessité d'assurer un mélange satisfaisant du produit chimique d'essai lorsque celui-ci est administré par le biais de la nourriture.

22. Les animaux sont encagés par petits groupes d'individus de même sexe; on peut encager les animaux individuellement si une nécessité scientifique le justifie. Dans le cas d'un encagement en groupe, le nombre d'animaux par cage ne doit pas dépasser cinq. L'accouplement doit avoir lieu dans des cages prévues à cet effet. Les femelles gravides doivent être placées dans des cages individuelles et disposer de matériaux nécessaires à la confection des nids. Les femelles allaitantes doivent être hébergées séparément avec leur portée.
23. La nourriture sera analysée régulièrement à la recherche de contaminants. Un échantillon de nourriture sera prélevé jusqu'à la finalisation du rapport.

Préparation des animaux

24. De jeunes adultes sains doivent être choisis au hasard pour être affectés aux groupes traités et aux cages. Les animaux sont marqués afin de permettre leur identification et sont placés dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude afin de les acclimater aux conditions du laboratoire.

Préparation des doses

25. Il est recommandé d'administrer le produit chimique d'essai par voie orale, à moins que d'autres voies soient considérées comme plus appropriées. Lorsque la voie orale est choisie, le produit chimique d'essai est généralement administré par gavage; toutefois, dans certains cas, les produits chimiques d'essai peuvent aussi être administrés dans l'alimentation ou dans l'eau de boisson.
26. Le cas échéant, le produit chimique d'essai est dissout ou mis en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé, dans la mesure du possible, de recourir en priorité à une solution ou à une suspension aqueuse, en second lieu à une solution dans l'huile (huile de maïs, par exemple), ou à défaut dans d'autres véhicules. Les caractéristiques de toxicité des véhicules, s'ils sont non aqueux, doivent être connues. La stabilité et le caractère homogène du produit chimique d'essai dans le véhicule doivent être déterminés.

MODE OPERATOIRE

Nombre et sexe des animaux

27. Il est recommandé de constituer des groupes d'au moins 10 males et 12-13 femelles. Avant le début de l'exposition, on évaluera les cycles œstraux chez les femelles, et les animaux qui ne présentent pas un cycle classique de 4-5 jours ne seront pas inclus dans l'étude; c'est pourquoi on recommande l'utilisation de femelles supplémentaires, pour parvenir à 10 femelles par groupe. Sauf dans le cas d'effets toxiques marqués, on devrait obtenir au

moins 8 femelles gravides par groupe, soit le nombre minimum généralement acceptable. Il s'agit d'aboutir à un nombre suffisant de gestations et à une progéniture suffisamment abondante pour permettre une évaluation fiable de l'action du produit chimique d'essai sur la fertilité, la gravidité, le comportement maternel et l'allaitement, ainsi que sur la croissance et le développement de la descendance F1 à partir de la conception jusqu'au 13ème jour après la parturition. S'il est prévu de sacrifier des animaux au cours de cette période, le nombre d'animaux d'essai doit être augmenté du nombre d'animaux qu'il est prévu de sacrifier avant le terme de l'étude. Il convient d'envisager l'adjonction d'un groupe satellite supplémentaire de cinq animaux par sexe dans le groupe témoin et dans le groupe soumis à la dose maximale afin d'observer la réversibilité, la persistance ou l'apparition d'effets toxiques systémiques différés, pendant au moins 14 jours après la fin du traitement. Les animaux du groupe satellite ne seront pas accouplés et ne pourront donc pas être utilisés pour évaluer la toxicité pour la reproduction et le développement.

Détermination des doses

28. En général, il faudra utiliser au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin. Si on ne dispose pas de données appropriées relatives à la toxicité générale, il y aura lieu d'effectuer une étude d'orientation (avec des animaux de même souche et même source) afin de déterminer les doses à utiliser. Exception faite de l'administration du produit chimique d'essai, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même manière que ceux des groupes soumis à l'essai. Si un véhicule est utilisé pour administrer le produit chimique d'essai, le groupe témoin doit en recevoir le volume administré le plus élevé.
29. La détermination des niveaux des doses doit prendre en compte toutes les données sur la toxicité et les caractéristiques (toxico-)cinétiques disponibles. Il faut aussi prendre en compte le fait que les femelles gestantes et non-gestantes peuvent présenter des sensibilités différentes. La dose la plus élevée doit être choisie de façon à provoquer des effets toxiques mais sans provoquer la mort ou des souffrances manifestes. Ensuite, il convient de déterminer les doses par ordre décroissant pour mettre en évidence toute relation entre traitement et réponse et, au niveau de la dose la plus faible, l'absence d'effets nocifs. On considère généralement optimal de définir des intervalles d'un facteur deux à quatre, l'intégration d'un quatrième groupe étant souvent jugé préférable à l'utilisation d'intervalles trop importants (supérieurs à un facteur de 10) entre les niveaux des doses.
30. En cas d'observation d'une toxicité générale (par exemple réduction du poids corporel, effets sur le foie, le cœur, les poumons ou les reins, etc.) ou d'autres modifications susceptibles de ne pas constituer une réponse toxique (par exemple diminution de la prise de nourriture, grossissement du foie), les effets observés sur les paramètres endocriniens devront être interprétés avec précaution.

Épreuve limite

31. Si l'administration orale d'une dose au moins égale à 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ou, en cas d'administration par le biais de l'alimentation, à un pourcentage équivalent dans la nourriture ou dans l'eau (en fonction du poids corporel), selon les modalités précisées pour cette étude, ne provoque aucun effet toxique observable et si aucune toxicité n'est à prévoir compte tenu des données relatives à des substances présentant une structure voisine, on peut juger qu'il n'est pas nécessaire d'entreprendre une étude complète faisant intervenir plusieurs niveaux de doses. Toutefois, l'exposition humaine prévisible peut conduire à retenir un niveau de dose plus élevé pour l'essai limite. Pour d'autres types d'administration, tels que l'inhalation et l'absorption par voie cutanée, les propriétés physico-chimiques des substances d'essai peuvent souvent dicter l'exposition maximale qui peut être mise en œuvre.

Administration des doses

32. Le produit chimique d'essai est administré aux animaux chaque jour de la semaine. En cas de gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique au moyen d'une sonde stomacale ou d'une canule d'intubation adaptée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal soumis à l'essai. Il ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf s'il s'agit d'une solution aqueuse pour laquelle le volume peut atteindre 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite de produits chimiques d'essai irritants ou corrosifs qui feront normalement apparaître des effets d'autant plus marqués que les concentrations seront élevées, la variabilité du volume d'essai devrait être réduite au minimum grâce à un ajustement de la concentration de sorte que le volume soit constant quel que soit le niveau de la dose.
33. En cas d'administration par le biais de l'alimentation ou de l'eau, il importe de veiller à ce que les quantités de produit chimique d'essai utilisées ne perturbent pas l'équilibre normal de la nutrition ou de l'hydratation. Lorsque le produit chimique d'essai est administré par la nourriture, on peut retenir soit une concentration constante dans les aliments (ppm), soit un niveau de dose constant par rapport au poids du corps de l'animal; l'option retenue doit être précisée. En cas d'administration par gavage, la dose doit être apportée quotidiennement à heures fixes et ajustée au moins une fois par semaine pour être maintenue à un niveau constant par rapport au poids du corps de l'animal. Lorsque l'étude combinée est une étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme ou à une étude approfondie de la toxicité pour la reproduction, il faut prendre soin d'assurer une alimentation identique dans les deux études.

Calendrier de l'étude

34. L'administration de la substance aux animaux des deux sexes doit commencer deux semaines avant l'accouplement, après une période d'acclimatation d'au moins cinq jours et après avoir observé que les femelles présentaient un cycle œstral normal (au cours d'une période prétraitement de 2 semaines). L'étude doit être programmée de telle sorte que l'accouplement débute peu après que les animaux ont atteint leur pleine maturité sexuelle. Celle-ci intervient à des âges qui varient légèrement selon les espèces et selon les laboratoires, à savoir 10 semaines pour les rats Sprague Dawley et 12 semaines environ pour les rats Wistar. Les femelles ayant mis bas doivent être sacrifiées le 13^{ème} jour qui suit la parturition ou peu après. Afin d'astreindre les femelles à un jeûne de douze heures avant le prélèvement de sang (si telle est l'option choisie), il n'est pas nécessaire de sacrifier les femelles et leur progéniture le même jour. Le jour de la naissance (où la parturition est achevée) marque le jour 0 de la période post partum. Les femelles qui ne montrent aucun signe de copulation sont sacrifiées 24 à 26 jours après le dernier jour de la période d'accouplement. L'administration de la substance d'essai aux mâles et aux femelles se poursuit durant la période d'accouplement. Au-delà, elle doit continuer pour les mâles, au moins jusqu'à la fin de la période totale d'administration, soit un minimum de 28 jours. Les mâles sont ensuite sacrifiés ou bien maintenus en vie et continuent alors à recevoir la substance d'essai en vue, le cas échéant, d'un second accouplement.
35. L'administration quotidienne du produit chimique d'essai aux femelles de la génération parentale doit continuer pendant toute la gestation et au moins jusqu'au 3^{ème} jour post partum inclus ou jusqu'au jour précédant le sacrifice. En ce qui concerne les études dans lesquelles le produit chimique d'essai est administré par inhalation ou par voie cutanée, l'administration doit se poursuivre au moins jusqu'au 19^{ème} jour inclus de la gestation, et l'administration doit être initiée à nouveau dès que possible et pas après le 4^{ème} jour suivant la naissance (jour post-naissance - JPN).
36. Les animaux appartenant au groupe satellite, réservés aux observations de suivi, si elles sont prévues, ne sont pas soumis à l'accouplement. Ils devraient être maintenus en vie sans être traités pendant 14 jours au moins après le premier sacrifice de femelles prévu, afin de déceler l'apparition différée, la persistance ou la disparition complète des effets toxiques.
37. On trouvera une représentation schématique du calendrier d'essai à l'appendice 2.

Cycle œstral

38. Les cycles œstraux sont contrôlés avant le début du traitement pour sélectionner pour l'étude des femelles présentant un cycle régulier (voir paragraphe 27). Les frottis vaginaux sont examinés chaque jour depuis le début du traitement jusqu'à la confirmation de l'accouplement. Si l'on suspecte que des effets liés à un stress aigu lors de l'initiation du traitement pourraient perturber le cycle œstral, les laboratoires peuvent exposer les

animaux de l'essai pendant deux semaines, puis effectuer des frottis vaginaux chaque jour pour contrôler le cycle œstral pendant un minimum de deux semaines débutant au début de la période de pré-accouplement et se poursuivant durant la période d'accouplement, jusqu'à ce que l'accouplement soit avéré. Pour obtenir des cellules vaginales ou cervicales, on prendra soin d'éviter d'agresser la muqueuse ce qui risquerait d'induire une pseudo-gestation (8) (9).

Modalités d'accouplement

39. On utilise normalement des couples 1:1 (un mâle pour une femelle). Il peut y avoir exception à cette règle si des mâles viennent à mourir. La femelle doit être placée avec le même mâle jusqu'à ce que la copulation soit avérée ou pendant deux semaines. Chaque matin, il convient d'examiner les femelles pour vérifier la présence de sperme ou d'un bouchon vaginal. Le jour 0 de la gestation est celui où l'accouplement est avéré (présence de sperme ou d'un bouchon vaginal). Lorsque le couple s'avère improductif, on peut envisager de ré-accoupler les femelles avec des mâles éprouvés du même groupe.

Taille des portées

40. Au quatrième jour après la naissance, on peut ajuster la taille de chaque portée en éliminant des petits surnuméraires choisis au hasard, afin de s'approcher autant que possible du nombre de quatre ou cinq petits par sexe par portée, en fonction de la taille normale d'une portée dans la souche de rats utilisée. Des échantillons de sang seront prélevés sur deux des animaux surnuméraires, mis en commun, et utilisés pour la détermination des niveaux sériques de T4. Il ne convient pas de procéder à une élimination sélective des petits, par exemple basée sur le poids corporel ou la distance ano-génitale (DAG). Lorsque le nombre de petits mâles et femelles est tel qu'il empêche de disposer de quatre ou cinq animaux de chaque sexe par portée, il est acceptable de procéder à des ajustements partiels (par exemple, six mâles et quatre femelles). Aucun petit ne sera éliminé quand la taille de la portée devient inférieure à la limite d'ajustement de 8 à 10 petits/portée. S'il n'existe qu'un petit surnuméraire au-dessus de la limite d'ajustement, alors ce seul petit surnuméraire sera éliminé et un échantillon de sang prélevé afin de déterminer la concentration sérique de T4.
41. Si la taille des portées n'est pas ajustée, deux petits par portée seront sacrifiés au 4^e jour après la naissance et des échantillons de sang seront prélevés pour la mesure des concentrations sériques d'hormones thyroïdiennes. Si possible, les deux petits par portée seront des femelles afin de réserver les mâles pour l'examen de la persistance du mamelon, exception faite du cas où l'élimination de ces petits ne laisse aucune femelle pour les évaluations terminales. Aucun petit ne sera éliminé quand la taille de la portée devient inférieure à la limite d'ajustement de 8 à 10 petits/portée (en fonction de la taille normale

d'une portée chez la souche de rats employée). S'il n'existe qu'un petit surnuméraire au-dessus de la limite d'ajustement, alors ce seul petit surnuméraire sera éliminé et un échantillon de sang prélevé afin de déterminer la concentration sérique de T4.

Observations

42. Tous les jours, les animaux doivent faire l'objet d'un examen clinique général, de préférence aux même(s) moments de la journée et en considérant la période du pic des effets attendus après administration des doses. L'état de santé des animaux doit être noté. Des observations de morbidité et de mortalité sont effectuées sur tous les animaux au moins deux fois par jour.
43. Chaque animal de la génération parentale doit faire l'objet d'un examen clinique détaillé avant la première exposition (pour permettre des comparaisons sur le même sujet) et au moins une semaine après. Ces examens doivent être effectués hors de la cage d'hébergement sur une aire standard. Ces observations doivent être soigneusement notées, de préférence au moyen de systèmes de notations explicitement définis par le laboratoire. Il faut s'efforcer de minimaliser les variations des conditions de l'essai et les examens doivent être conduits de préférence par des observateurs tenus dans l'ignorance du traitement. Les observations notées devraient porter, sans que cette liste soit exhaustive, sur les modifications de la peau, de la fourrure, des yeux, des membranes muqueuses, sur l'apparition de sécrétions et d'excrétions et sur les activités réflexes (par exemple larmes, érection des poils, diamètre de la pupille, rythme respiratoire inhabituel). Il convient également de noter tout changement de la démarche, de la posture, de la réaction à la manipulation ainsi que l'apparition de mouvements spasmodiques ou de contractures, de stéréotypes (par exemple toilettage excessif, circuits répétitifs), parturition difficile ou prolongée ou comportements bizarres (par exemple automutilation, marche à reculons) (11).
44. A un certain moment au cours de l'étude, il convient également d'étudier la réactivité sensorielle à des stimuli de divers types (par exemple stimuli auditif, visuel et proprioceptif) (8) (9) (11), la force de préemption (12) et l'activité motrice (13). Ces études doivent être menées sur cinq mâles et cinq femelles choisis au hasard dans chaque groupe. On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées plus de détails sur les modes opératoires. Toutefois, il est possible de recourir à d'autres modes opératoires. Chez les mâles, ces observations fonctionnelles devraient être effectuées vers la fin de la période d'administration de la substance d'essai, peu de temps avant la date prévue pour leur sacrifice mais avant l'échantillonnage du sang pour les analyses hématologiques ou de chimie clinique (voir paragraphes 53-56 ainsi que la note de bas de page relative à ces paragraphes). Les femelles devraient se trouver dans le même état physiologique au cours

de ces tests fonctionnels qui devraient être menés, de préférence une fois au cours de la dernière semaine de lactation (par exemple, 6^e-13^e jour de lactation), peu de temps avant la date fixée pour leur sacrifice. Dans la mesure du possible, il faudra limiter le plus possible la durée des périodes de séparation des mères et des petits.

45. On peut omettre ces observations fonctionnelles à effectuer une fois vers la fin de l'étude lorsque cette dernière est une étude d'orientation préliminaire à une étude ultérieure subchronique (90 jours) ou à long terme. Dans ce cas, les observations fonctionnelles devraient être effectuées au cours de l'étude à plus long terme. Dans d'autres cas, les données disponibles sur les observations fonctionnelles dans cette étude à dose répétée peuvent augmenter la capacité de choisir les doses pour une étude consécutive subchronique ou à long terme.
46. À titre exceptionnel, on peut également omettre les observations fonctionnelles pour des groupes qui manifestent des effets toxiques à un niveau qui risquerait d'interférer significativement avec les résultats des essais fonctionnels.
47. Il convient de noter la durée de la gestation, calculée à partir du jour 0 défini ci-dessus. Chaque portée devrait être examinée aussitôt que possible après sa mise-bas afin de déterminer le nombre et le sexe des petits, des mort-nés, des vivants, des avortons (petits d'une taille nettement inférieure à celle des individus témoins) ainsi que la présence de grosses anomalies.
48. Il convient de dénombrer et de déterminer le sexe des petits vivants et de peser les portées dans les 24 heures suivant la parturition (jour 0 ou 1 post partum), et au moins les 4^e et 13^e jours post partum. Outre les observations portant sur les animaux parents (voir paragraphes 43 et 44) il faut noter tout comportement anormal des rejetons.
49. On mesure la DAG de chaque petit au même jour suivant la naissance, entre les JPN 0 et 4. Le poids corporel des petits est relevé le jour de la mesure de la DAG; la DAG est rapportée à une mesure de la taille du petit, de préférence la racine cubique du poids corporel (14). On devra compter le nombre de mamelons/aréoles chez les petits mâles aux JPN 12 ou 13, comme le document d'orientation 151 de l'OCDE le recommande (15).

Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau

50. Les mâles et les femelles doivent être pesés le premier jour d'administration de la substance d'essai, puis au moins une fois par semaine, ainsi que le dernier jour. Au cours de la gestation, les femelles doivent être pesées les jours 0, 7, 14 et 20, et dans les 24 heures qui suivent la parturition (jour 0 ou 1 post partum), ainsi que les 4^e et 13^e

jours post partum. Ces observations sont à enregistrer de manière individuelle pour chaque animal adulte.

51. Durant les périodes de pré-accouplement, de gestation et de lactation, la consommation alimentaire doit être mesurée au moins une fois par semaine. Cette mesure est facultative pendant la période d'accouplement. La consommation d'eau doit également être mesurée durant les périodes en question lorsque le produit chimique d'essai est administré par ce moyen.

Hématologie

52. Une fois au cours de l'étude, il convient d'effectuer sur cinq mâles et cinq femelles choisis au hasard dans chaque groupe les examens hématologiques suivants: hématocrite, concentrations d'hémoglobine, comptage des érythrocytes, réticulocytes, comptage total et différentiel des leucocytes, comptage des plaquettes et mesure du temps et du potentiel de coagulation du sang. D'autres analyses telles que la concentration en méthémoglobine et les corps de Heinz seront réalisées si le produit chimique d'essai ou ses métabolites supposés ont ou sont suspectés d'avoir des propriétés oxydantes.
53. Les échantillons de sang doivent être prélevés sur un site bien déterminé. Les femelles doivent se trouver dans le même état physiologique au cours de l'échantillonnage. Afin d'éviter des difficultés pratiques liées à la variabilité du début de la gestation, les prélèvements de sang chez les femelles doivent être effectués à la fin de la période de pré-accouplement au lieu d'être prélevé juste avant ou au cours du sacrifice des animaux. Les échantillons de sang des mâles devraient de préférence être prélevés juste avant, ou pendant le sacrifice des animaux. On peut aussi prélever le sang des mâles à la fin de la période de pré-accouplement au cas où cette option aurait été choisie pour les femelles.
54. Les échantillons de sang doivent être conservés dans des conditions adéquates.

Biochimie clinique

55. Les études de biochimie clinique ont pour objet d'étudier les principaux effets toxiques sur les tissus et, plus précisément, sur le rein et le foie. Elles doivent être exécutées sur des échantillons de sang prélevés sur les cinq mâles et les cinq femelles choisis dans chaque groupe. Il est recommandé d'effectuer les prélèvements de sang sur des animaux à jeun

depuis la veille au soir¹. L'étude du plasma ou du sérum comporte la détermination des substances ci-après:: sodium, potassium, glucose, cholestérol total, urée, créatinine, protéines totales et albumine, au moins deux enzymes indicatrices d'effets sur les cellules hépatiques (telles que l'alanine-aminotransférase, l'aspartate-aminotransférase et la sorbitol-déshydrogénase) ainsi que les acides biliaires. Dans certaines circonstances, la mesure d'autres enzymes (hépatiques ou autres) et de la bilirubine peut fournir des informations utiles.

56. Des échantillons sanguins sont prélevés sur un site défini selon le schéma suivant:

- chez au moins deux petits par portée au jour 4 après la naissance, si le nombre de petits le permet (voir paragraphes 40-41);
- chez toutes les mères et chez au moins deux petits par portée à la fin de l'expérience au jour 13, et
- chez les adultes mâles à la fin de l'expérience.

Tous ces échantillons sont conservés dans des conditions appropriées. Les échantillons de sang des petits à JPN13 et des adultes mâles font l'objet d'un dosage sérique d'hormones thyroïdiennes (T4). D'autres évaluations de T4 dans les échantillons de sang des mères et des petits à JPN 4 peuvent être réalisées, le cas échéant. De manière optionnelle on pourra mesurer d'autres hormones, le cas échéant. Le sang des petits peut être mis en commun par portée pour l'analyse des hormones thyroïdiennes. Les hormones thyroïdiennes (T4 et TSH) seront de préférence mesurées sous forme «totale».

57. À titre facultatif, on peut effectuer les observations ci-après sur les urines de cinq mâles choisis au hasard dans chaque groupe, recueillies pendant un intervalle de temps déterminé

¹ Pour un certain nombre de mesures sur le sérum ou le plasma, notamment pour la mesure du glucose, il est préférable de prélever le sang sur l'animal à jeun depuis la veille. La principale raison de cette préférence tient au fait que si l'animal n'est pas à jeun les résultats seront inévitablement plus variables, ce qui tendra à masquer les effets les moins évidents et rendra l'interprétation des résultats plus difficile. D'autre part, le maintien à jeun de l'animal peut interférer avec le métabolisme général des animaux (gravides), perturber les comportements de lactation et d'allaitement et pourrait perturber, surtout dans les études de nutrition, l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Si on adopte la pratique du prélèvement à jeun depuis la veille au soir, les analyses de biochimie clinique devraient être exécutées après les observations fonctionnelles à effectuer pendant la 4ème semaine de l'étude.

au cours de la dernière semaine de l'étude: apparence, volume, osmolalité ou masse volumique, pH, protéines, glucose, sang/cellules sanguines.

58. En outre, on peut envisager de rechercher dans le sérum des indicateurs de dommages aux tissus. D'autres analyses pourraient être effectuées si les propriétés connues du produit chimique d'essai sont susceptibles, ou peuvent être soupçonnées, de perturber des activités métaboliques et leurs indicateurs tels que le calcium, les phosphates, les triglycérides à jeun, le glucose à jeun, certaines hormones, la méthémoglobine et la cholinestérase. Le dosage de ces substances se fera au cas par cas.
59. Les facteurs suivants peuvent influencer la variabilité et les concentrations absolues des déterminations hormonales:
- le moment du sacrifice, à cause des variations diurnes des concentrations hormonales,
 - la méthode de sacrifice, qui devra éviter un stress inutile chez les animaux pouvant affecter les concentrations en hormones thyroïdiennes
 - les kits d'essai pour les déterminations hormonales, dont les courbes standards peuvent différer d'un kit à l'autre.
60. Les échantillons de plasma spécifiquement destinés à la détermination des hormones doivent être obtenus à des moments de la journée comparables. Les valeurs numériques obtenues lors de l'analyse des concentrations hormonales diffèrent en fonction du kit commercial utilisé.
61. Si l'on ne dispose pas d'une base de données historiques adéquate, il faut envisager de déterminer les paramètres hématologiques et biochimiques avant d'administrer la substance d'essai, ou de façon préférable, réaliser ces déterminations dans un groupe d'animaux qui ne soit pas inclus dans le groupe d'animaux de l'expérience. Pour les femelles, les données doivent provenir des femelles allaitantes.

PATHOLOGIE

Autopsie générale

62. Tous les animaux adultes étudiés doivent faire l'objet d'une autopsie générale complète et détaillée qui comporte un examen minutieux de la surface externe du corps, de tous les orifices et des cavités crânienne, thoracique et abdominale ainsi que du contenu de ces cavités. On s'intéressera plus particulièrement aux organes de l'appareil reproducteur. Le nombre de sites d'implantation d'embryons doit être consigné. Les frottis vaginaux sont examinés le matin du jour de la nécropsie pour déterminer quelle est la phase du cycle

œstral et permettre une corrélation avec l'histopathologie des organes reproducteurs femelles.

63. Les testicules et épидидymes de même que la prostate et les vésicules séminales avec les glandes de coagulation entières de tous les animaux mâles adultes devront être débarrassés de tout tissu adhérent si nécessaire, et leur poids mesuré aussitôt après la dissection pour éviter toute déshydratation. En outre, il est possible de relever le poids d'autres organes, tels que le complexe des muscles élévateur de l'an us et bulbo-caverneux, les glandes de Cowper et le gland du pénis chez les mâles, et les ovaires et l'utérus (y compris le col) chez les femelles. Le cas échéant, ces mesures doivent être effectuées aussitôt que possible après la dissection. Les ovaires, les testicules, les épидидymes, les organes sexuels accessoires, et tous les organes des animaux adultes présentant des lésions macroscopiques seront conservés.
64. La glande thyroïde de tous les adultes mâles et femelles ainsi que d'un male et d'une femelle de 13 jours de chaque portée doit être préservée dans le milieu de fixation le plus approprié en vue des examens histopathologiques prévus ultérieurement. Le poids de la thyroïde peut être déterminé après la fixation. L'élimination des tissus adhérents doit également s'opérer avec beaucoup de soin et seulement après la fixation pour éviter d'abîmer les tissus, et par là de compromettre l'analyse d'histopathologie. Des échantillons de sang doivent être prélevés à un endroit spécifié juste avant ou pendant la procédure d'euthanasie des animaux, et stockés dans des conditions appropriées (voir paragraphe 56).
65. En outre, on choisira au hasard au moins cinq mâles et cinq femelles adultes dans chaque groupe (à l'exception de ceux identifiés comme moribonds et/ou euthanasiés avant la fin de l'étude) dont on prélèvera le foie, les reins, les glandes surrénales, le thymus, la rate, le cerveau et le cœur, débarrassés de tout tissu adhérent si nécessaire, et seront pesés aussitôt après dissection afin d'éviter toute déshydratation. Les tissus ci-après seront prélevés pour les conserver dans le milieu de fixation le plus approprié, en fonction du type de tissu et des examens histopathologiques que l'on entend effectuer: toutes les lésions importantes, le cerveau (les régions représentatives comportant l'encéphale, le cervelet et la protubérance annulaire), la moelle épinière, l'œil, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, les reins, les surrénales, la rate, le cœur, le thymus, la trachée et les poumons (qui seront conservés par injection d'un fixateur suivie d'une immersion), les gonades (testicules et ovaires), les organes sexuels accessoires (utérus et col de l'utérus, épидидymes, prostate, vésicule séminales et glandes coagulantes), le vagin, la vessie, les ganglions lymphatiques (le ganglion lymphatique le plus proximal et un autre, en fonction de l'expérience du laboratoire(16)), un nerf périphérique (le sciatique ou le tibial) de préférence tout près du muscle, un muscle squelettique et un os, avec la moelle osseuse (coupe ou à défaut une ponction examinée immédiatement). Il est recommandé de fixer les

testicules par immersion dans un fixateur de Bouin ou de Davidson modifié (16) (7) (18); la fixation au formol est déconseillée pour ces tissus. La tunique albuginée peut être perforée en douceur et de façon superficielle aux deux pôles de l'organe avec une aiguille permettant une pénétration rapide du liquide de fixation. Les résultats des observations cliniques et des autres observations pourraient inciter à l'examen d'autres tissus. On devrait également conserver tout autre organe considéré comme étant susceptible d'être un organe cible d'après les propriétés connues du produit chimique d'essai.

66. Les tissus suivants peuvent apporter des informations utiles sur les effets endocriniens: gonades (ovaires et testicules), organes sexuels accessoires (utérus et col de l'utérus, épидидymes, vésicules séminales et glande coagulante, prostate dorsolatérale et ventrale), vagin, hypophyse, glande mammaire mâle et glande surrénale. Les changements survenant dans les glandes mammaires mâles n'ont pas encore été insuffisamment documentés, mais ce paramètre peut s'avérer très sensible aux substances à action oestrogénique. L'observation des organes/tissus non cités au paragraphe 65 est facultative.
67. Les petits morts ainsi que ceux qui sont sacrifiés au 13^{ème} jour post partum, ou peu après, doivent être au moins soumis à un examen externe rigoureux visant à déterminer d'éventuelles anomalies flagrantes. Une attention particulière devra être apportée aux organes génitaux reproducteurs externes, pour lesquels on recherchera des signes de modification de leur développement.

Histopathologie

68. On doit effectuer un examen histopathologique approfondi des organes et des tissus conservés et prélevés sur les animaux choisis dans le groupe témoin et dans le groupe exposé à de fortes doses (en mettant l'accent sur les phases de spermatogénèse dans les gonades mâles et sur l'examen histopathologique des structures cellulaires interstitielles des testicules). La glande thyroïde des petits et des animaux adultes restants pourra être examinée si nécessaire. Au cas où l'on observerait des modifications liées au traitement dans le groupe exposé à des doses élevées, il convient d'étendre ces examens à des animaux des autres groupes traités. Le document d'orientation sur l'histopathologie (10) donne plus de détails sur la dissection, la fixation, la section et l'histopathologie des tissus endocriniens.
69. Toutes les lésions importantes doivent être examinées. Afin d'aider à définir la concentration sans effet nocif observé (CSENO), il conviendra d'examiner des organes cibles dans d'autres groupes exposés, en particulier dans les groupes correspondant à des niveaux de dose égaux ou inférieurs à la CSENO.

70. En cas d'utilisation d'un groupe satellite, les examens histopathologiques doivent être effectués sur des tissus et des organes sur lesquels des effets ont été décelés dans les groupes traités.

RESULTATS ET RAPPORT

Résultats

71. Des données individuelles sont à fournir pour chaque animal. Elles doivent en outre être présentées sous la forme d'un tableau indiquant pour chaque groupe étudié le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux morts au cours de l'essai ou euthanasiés, ainsi que le moment de la mort ou de l'euthanasie, le nombre d'animaux fertiles, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, une description des signes de toxicité observés, comprenant le moment du déclenchement, la durée et la gravité des effets toxiques éventuels, les types de modifications histopathologiques, ainsi que toutes les informations dignes d'intérêt concernant les portées. On trouvera à l'annexe 3 un modèle de rapport succinct sous forme de tableau qui s'avère très utile pour l'évaluation des effets sur la reproduction et le développement.
72. Chaque fois que c'est possible, les résultats numériques devraient être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée et généralement acceptée. Les comparaisons de l'effet en fonction de la dose utilisée ne devront pas utiliser de tests-t multiples. Les méthodes statistiques utilisées devraient être choisies lors de la conception de l'étude. L'analyse statistique de la DAG et de persistance du mamelon doit être basée sur les données individuelles des petits, en prenant en compte les effets sur la portée. S'il y a lieu, l'unité d'analyse sera la portée. L'analyse statistique du poids corporel des petits doit être basée sur les données individuelles des petits, en prenant en compte la taille de la portée. Compte tenu de la portée restreinte de l'étude, l'analyse statistique visant à vérifier le caractère significatif des résultats n'a qu'une valeur limitée pour de nombreux effets observés, notamment les effets sur la reproduction. Certaines des méthodes les plus couramment utilisées, notamment les tests paramétriques pour mesurer la tendance centrale sont inappropriées. Si une analyse statistique est réalisée, la méthode retenue doit convenir à la distribution de la variable examinée et doit être arrêtée préalablement à la mise en route de l'étude.

Évaluation des résultats

73. Les résultats de cette étude sur la toxicité doivent être évalués en fonction des effets observés, de l'autopsie et des données microscopiques. L'évaluation portera notamment sur le lien entre, d'une part, la dose du produit chimique d'essai et, d'autre part, la présence ou

l'absence, l'incidence et la gravité des anomalies, y compris les lésions grossières, les organes cibles désignés, l'infertilité, les anomalies cliniques, l'action sur la reproduction et les portées, les modifications du poids corporel, les effets sur la mortalité et tout autre effet toxique.

74. La période de traitement du mâle étant de courte durée, l'histopathologie des testicules et des épидидymes doit aller de pair avec les données sur la fertilité dans le cadre de l'évaluation des effets sur la reproduction chez le mâle. L'utilisation des données des témoins historiques pour la reproduction/développement (par exemple pour la taille des portées, DAG, persistance du mamelon, taux sériques de T4), pourrait, le cas échéant, s'avérer être une aide utile pour l'interprétation des données.
75. Pour le contrôle de la qualité, il est proposé que les données des témoins historiques soient collectées et que les coefficients de variation soient calculés dans le cas de données numériques, tout particulièrement pour les paramètres en lien avec la détection de perturbateurs endocriniens. Ces données peuvent être utilisées à des fins de comparaison quand les études sont évaluées.

Rapport

76. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Produit chimique d'essai:

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation si c'est disponible;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue.

Substance mono-constituant:

- apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;
- 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:

- caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Véhicule (s'il y a lieu):

- raisons justifiant le choix du véhicule lorsqu'il ne s'agit pas d'eau.

Animaux soumis à l'essai:

- espèce et souche;
- nombre, sexe et âge des animaux;
- origine, conditions d'encagement, type d'alimentation, etc.;
- poids de chaque animal au début de l'essai;
- justification de l'espèce si l'espèce choisie n'est pas le rat.

Conditions de l'essai:

- critères de choix des niveaux de doses;
- précisions concernant la formulation du produit chimique d'essai et de la préparation de l'alimentation, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation;
- description détaillée de l'administration du produit chimique d'essai;
- conversion de la concentration du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau (ppm) en dose effective (mg/kg de poids corporel/jour), le cas échéant;
- précisions concernant la qualité des aliments et de l'eau;
- description détaillée des protocoles de randomisation utilisés pour sélectionner les petits éliminés de la portée, s'il y a eu élimination.

Résultats:

- modifications du poids corporel;
- données relatives à la consommation d'aliments et d'eau, le cas échéant;
- données sur les effets toxiques provoqués en fonction du sexe et de la dose, concernant notamment la fertilité, la gestation et tout autre signe de toxicité;
- durée de la gestation;
- effets toxiques ou autres sur la reproduction, la progéniture, la croissance post-natale, etc.;
- nature, gravité et durée des manifestations cliniques observées (réversibles ou non);
- évaluations de l'activité sensorielle, de la force de préhension et de l'activité motrice;
- analyses de sang et valeurs normales de référence;
- analyses de biochimie clinique et valeurs normales de référence;
- nombre de femelles adultes présentant un cycle œstral normal ou anormal et durée du cycle;

- nombre de petits vivants à la naissance et pertes après implantation;
- nombre de petits présentant des anomalies évidentes, évaluation macroscopique des organes génitaux externes, nombre d'avortons;
- indication du moment de la mort survenue pendant l'étude, ou si l'animal a survécu jusqu'à la fin;
- nombre d'embryons implantés, taille et poids des portées au moment de la consignation de ces données;
- données relatives au poids corporel des petits;
- DAG de tous les petits (et poids corporel le jour de la mesure de la DAG);
- persistance du mamelon chez les petits mâles;
- taux d'hormones thyroïdiennes chez les petits âgés de 13 jours et les mâles adultes (ainsi que chez les mères et chez les petits âgés de 4 jours si cela a été mesuré);
- poids corporel lors du sacrifice et poids des organes des animaux de la génération parentale;
- résultats de l'autopsie;
- description détaillée de l'examen histopathologique;
- données sur l'absorption (si elles sont disponibles);
- traitement statistique des résultats, le cas échéant.

Examen des résultats.

Conclusions.

Interprétation des résultats

77. L'étude permettra d'évaluer la toxicité pour la reproduction et le développement liée à l'administration de doses répétées. Puisque l'accent est mis à la fois sur la toxicité générale et sur les effets toxiques sur la reproduction et le développement, les résultats de l'étude permettront de faire une distinction entre les effets toxiques pour la reproduction et pour le développement se produisant en l'absence de toxicité générale et les effets qui ne s'expriment qu'à des niveaux qui sont également toxiques pour les parents (voir paragraphes 7-11). Elle pourrait aider à déterminer s'il y a lieu d'approfondir les recherches et fournir des orientations pour la conception d'études ultérieures. Le document d'orientation n° 43 de l'OCDE devra être consulté pour aider à l'interprétation des résultats liés à la reproduction et au développement (19). Le document d'orientation n° 106 de l'OCDE sur l'évaluation histologique des essais endocriniens et de reproduction chez les

rongeurs (16) fournit des informations sur la préparation et l'évaluation des organes (endocriniens) et des frottis vaginaux; ces informations peuvent être utiles dans le cadre de la présente méthode d'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation de coopération et de développement économiques, Paris
- (2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponible sur demande auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques, Paris
- (3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J. Toxicol, Sci.*, 19, 141-149.
- (4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 18, 89-95.
- (5) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Disponible sur demande auprès de l'Organisation de coopération et de développement économiques, Paris
- (6) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

- (9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).
- (11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
- (12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
- (13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 599-609.
- (14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (15) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (16) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 106) Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.
- (18) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.

- (19) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (20) OCDE (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

Appendice 1

DÉFINITIONS (VOIR AUSSI LE DOCUMENT D'ORIENTATION N° 150 DE L'OCDE (20))

Androgénicité: capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un organisme mammifère.

Antiandrogénicité: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un organisme mammifère.

Antioestrogénicité: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone oestrogénique naturelle (par exemple le 17 β -oestradiol) chez un organisme mammifère.

Activité antithyroïdienne: capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple T₃) chez un organisme mammifère.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Toxicité pour le développement: prolongement de la toxicité pour la reproduction, qui se traduit pour la progéniture par des perturbations prénatales, périnatales, post-natales, structurelles ou fonctionnelles.

Dose: quantité de produit chimique d'essai administrée, exprimée en poids (g, mg) ou en poids par unité de poids de l'animal soumis à l'essai (mg/kg, par exemple), ou encore en concentration dans l'aliment (ppm).

Détermination des doses: notion générale englobant la dose, ainsi que la fréquence et la durée d'administration.

Toxicité évidente: notion générale qui renvoie aux signes incontestables de toxicité consécutifs à l'administration de la substance d'essai. Ceux-ci doivent être suffisants pour permettre d'évaluer le danger et se manifester de telle manière qu'une augmentation de la dose administrée se traduira selon toute vraisemblance par l'apparition de signes de grave toxicité conduisant probablement à la mort.

Altération de la fertilité: perturbation des fonctions ou de la capacité de reproduction chez le mâle ou chez la femelle.

:Toxicité pour la femelle gravide: effets défavorables sur la femelle gravide, spécifiques (effets directs) ou non (effets indirects), et liés à la gestation.

CSENO: concentration sans effet nocif observé. C'est la dose la plus élevée pour laquelle on n'observe aucun effet dommageable lié au traitement.

Oestrogénicité: c'est la capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone naturelle oestrogénique (par exemple le 17 β -oestradiol) chez un organisme mammifère.

Toxicité pour la reproduction: effets préjudiciables sur la progéniture ou altération des fonctions ou de la capacité de reproduction chez le mâle et chez la femelle.

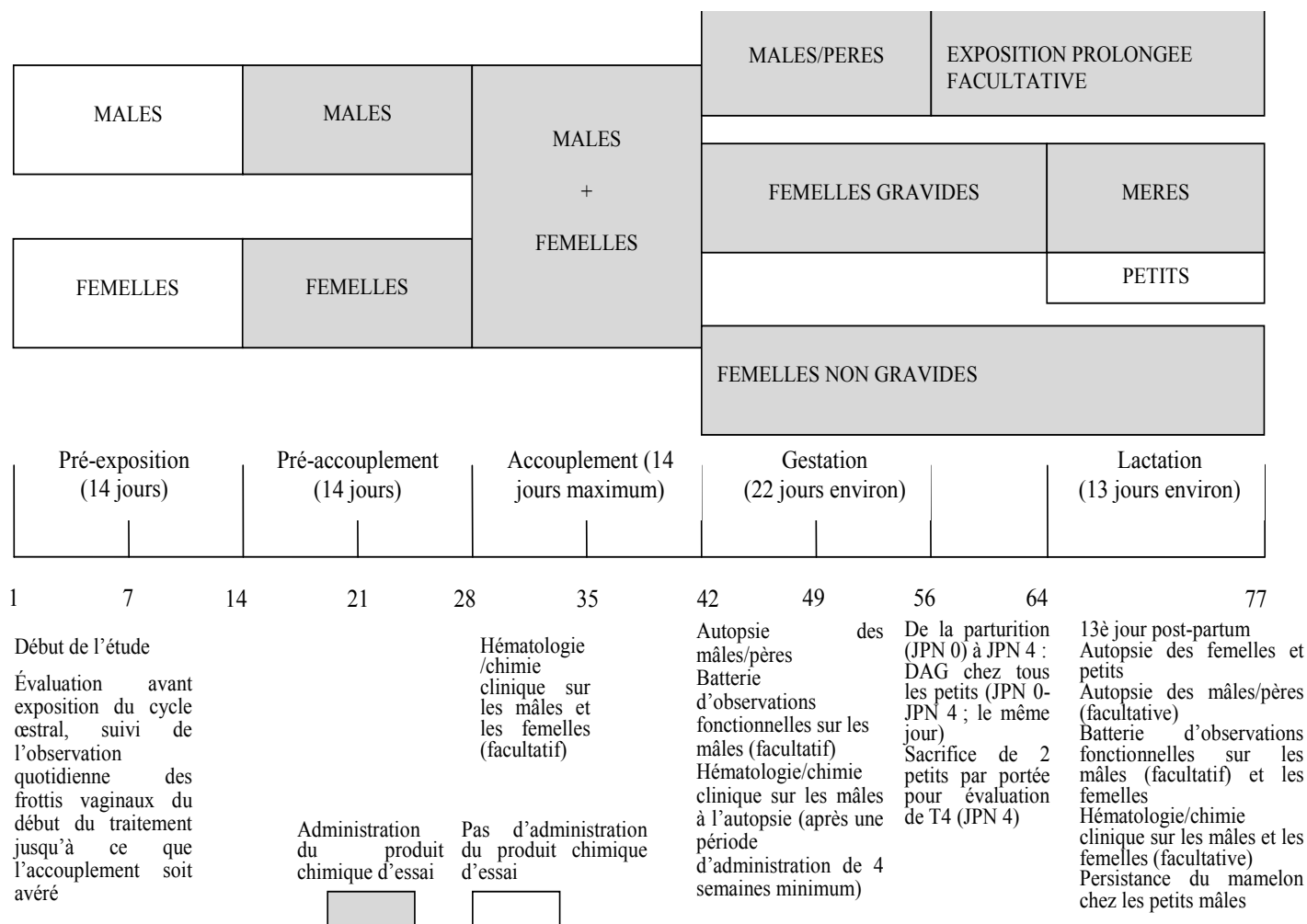
Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Activité thyroïdienne: c'est la capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple T₃) chez un organisme mammifère.

Validation: processus scientifique visant à caractériser les exigences opératoires et les limites d'une méthode de test et à en démontrer la fiabilité et la pertinence pour un objectif particulier.

Appendice 2

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PROGRAMME D'ESSAI INDIQUANT LA DUREE MAXIMALE DE L'ETUDE, POUR UNE PERIODE D'ACCOUPLEMENT COMPLETE DE 14 JOURS



Appendice 3

TABLEAU RECAPITULATIF DES EFFETS SUR LA REPRODUCTION ET LE DEVELOPPEMENT

OBSERVATIONS	VALEURS				
Dose administrée (unités).....	0 (témoin)	...	...	...	...
Couples formés (N)					
Cycle œstral (au moins durée moyenne et fréquence de cycles irréguliers)					
Femelles présentant signes d'accouplement (N)					
Femelles gravides (N)					
Jours conception 1-5 (N)					
Jours conception 6-... ⁽¹⁾ (N)					
Gestation ≤ 21 jours (N)					
Gestation = 22 jours (N)					
Gestation ≥ 23 jours (N)					
Mères ayant mis bas petits vivants (N)					
Mères ayant petits vivants au 4ème jour post partum (N)					
Embryons implantés/mère (moyenne)					
Petits vivants/mère à la naissance (moyenne)					
Petits vivants/mère au 4ème jour post partum (moyenne)					
Rapport mâles/femelles à la naissance (moyenne)					
Rapport mâles/femelles au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des portées à la naissance (moyenne)					
Poids des portées au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des petits à la naissance (moyenne)					
Poids des petits au moment de la mesure de la DAG (moyenne des mâles, moyenne des femelles)					
DAG des petits mesurée le même jour post natal, entre la naissance et JPN 4 (moyenne des mâles, moyenne des femelles, noter le JPN)					
Poids des petits au 4ème jour post partum (moyenne)					
Poids des petits au 13ème jour post partum (moyenne)					
Persistance du mamelon chez les petits mâles au jour 13 post					

⁽¹⁾ dernier jour de la période d'accouplement

partum (moyenne)					
PETITS PRESENTANT DES ANOMALIES					
Mères affectées par 0					
Mères affectées par 1					
Mères affectées par ≥ 2					
PERTES DE DESCENDANCE					
Pertes prénatales/après implantation (embryons implantés moins petits vivants à la naissance)					
Femelles affectées par 0					
Femelles affectées par 1					
Femelles affectées par 2					
Femelles affectées par ≥ 3					
Pertes post-natales (Petits vivants à la naissance moins petits vivants au 13ème jour post partum)					
Femelles affectées par 0					
Femelles affectées par 1					
Femelles affectées par 2					
Femelles affectées par ≥ 3					

B.65 MÉTHODE D'ESSAI *IN VITRO* SUR MEMBRANE D'ÉTANCHÉITÉ POUR LA CORROSION CUTANÉE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice⁴³⁵ (2015) de l'OCDE. La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions irréversibles de la peau, qui se manifestent sous forme de nécroses visibles dans l'épiderme et jusque dans le derme, après application d'un produit chimique d'essai, tel que défini par le Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations-Unies (ONU) (1) et le règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (ci-après le «règlement CLP»)¹. Cette méthode d'essai, , équivalente à la ligne directrice 435 mise à jour de l'OCDE propose une méthode d'essai *in vitro* sur membrane d'étanchéité qui peut être utilisée pour identifier les produits chimiques corrosifs. La méthode d'essai emploie une membrane artificielle conçue pour réagir au traitement par des produits chimiques de façon similaire à de la peau d'animaux vivants.
2. La corrosivité cutanée est habituellement évaluée en appliquant le produit chimique testé sur la peau d'animaux vivants et en déterminant l'ampleur de la lésion tissulaire après un intervalle de temps donné (2). Outre la présente méthode d'essai, un certain nombre de méthodes *in vitro* ont été adoptées comme alternatives (3) (4) à la méthode standard *in vivo* sur lapin (Chapitre B.4 de la présente annexe, équivalent à la ligne directrice 404) utilisée pour identifier les produits chimiques corrosifs (2). La stratégie d'essai et d'évaluation à plusieurs niveaux du SGH de l'ONU pour l'estimation et la classification de la corrosivité cutanée, ainsi que le document Guide de l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation (IATA) pour l'irritation et la corrosion de la peau autorise l'utilisation de procédés d'essai *in vitro* validés et acceptés tels que décrits dans les modules 3 et 4 (1) (5). Le Document guide IATA décrit plusieurs modules qui rassemblent les sources d'information et les outils d'analyse et (i) fournit des orientations sur la façon d'intégrer et d'utiliser les données d'essais et autres données pour l'évaluation du potentiel d'irritation ou de corrosion de la peau des produits chimiques d'essai et (ii) propose une approche quand des essais supplémentaires sont requis, y compris quand des résultats

¹ Règlement (EC) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

négatifs sont obtenus (5). Grâce à cette approche modulaire, les résultats positifs de méthodes d'essai *in vitro* peuvent servir à classer un produit chimique dans la catégorie corrosive sans impliquer d'essais sur les animaux, ce qui réduit et optimise l'usage des animaux et évite la douleur et les souffrances infligées aux animaux concernés.

3. Des études de validation du modèle *in vitro* de membrane d'étanchéité disponible dans le commerce sous l'appellation Corrositex[®] (6)(7)(8) ont été réalisées, démontrant une précision de 79% pour la prédiction de la corrosivité de la peau (128/163), une sensibilité de 85% (76/89), et une spécificité de 70% (52/74) pour une base de données de 163 produits chimiques (substances et mélanges) (7). Une fois la validité de cette méthode de référence (MRV) reconnue, son utilisation a été recommandée dans le cadre d'une stratégie d'essai à plusieurs niveaux pour évaluer le risque potentiel de corrosion dermique engendré par des produits chimiques (5) (7). Préalablement à l'utilisation d'un modèle *in vitro* de membrane d'étanchéité pour évaluer la corrosion cutanée à des fins réglementaires, il convient de déterminer sa fiabilité, sa pertinence (précision) et ses limites afin de garantir son équivalence à celle de la MRV (9), en accord avec les standards de performances pré-définis (10). L'acceptation mutuelle des données ne sera garantie qu'après examen et intégration de toute méthode d'essai nouvelle ou actualisée proposée et conforme aux normes de performance dans la méthode d'essai équivalente de l'OCDE. Actuellement, la ligne directrice 435 de l'OCDE et la présente méthode d'essai ne couvrent qu'une seule méthode *in vitro*: le modèle Corrositex[®], disponible dans le commerce.
4. D'autres méthodes pour les essais de corrosion cutanée se basent sur l'utilisation de peau humaine reconstituée (ligne directrice 431 de l'OCDE) (3) et de la peau de rat isolée (ligne directrice 430 de l'OCDE) (4). La présente méthode d'essai permet également de sous-catégoriser les produits chimiques corrosifs en trois sous-catégories du SGH et dans les trois groupes d'emballage ONU pour les transports pour le risque de corrosivité. Cette méthode d'essai a été adoptée initialement en 2006, et mise à jour en 2015 pour faire référence au Document guide IATA, et mettre à jour la liste des substances d'épreuve de compétence.

DÉFINITIONS

5. Les définitions utilisées figurent dans l'appendice.

CONSIDÉRATIONS INITIALES ET LIMITATIONS

6. L'essai décrit dans cette méthode d'essai permet d'identifier les substances et mélanges chimiques corrosifs et de les classer en sous-catégories de substances corrosives conformément au SGH de l'ONU/CLP (tableau 1) (1). Ce procédé d'essai peut également contribuer aux décisions prises sur la corrosivité et la non corrosivité de classes spécifiques de produits chimiques, par exemple, les acides organiques et minéraux, les dérivés acides¹, et les bases dans certains cas d'essais de transport (7)(11)(12). La présente méthode d'essai décrit un protocole générique similaire à un procédé d'essai de référence validé (7). Si la présente méthode d'essai ne fournit pas de données adéquates pour l'irritation de la peau, il convient de noter en revanche que la méthode d'essai B.46 (équivalente à la méthode d'essai 439 de l'OCDE) concerne spécifiquement l'irritation cutanée *in vitro* (13). Pour effectuer une évaluation complète des effets locaux sur la peau faisant suite à une exposition cutanée unique, le Document guide n° 203 sur IATA doit être consulté (5).

Tableau 1: La catégorie et les sous-catégories de corrosivité cutanée du SGH de l'ONU (1)

Catégorie de corrosivité (catégorie 1) (pour les autorités qui n'utilisent pas de sous-catégories)	Sous-catégories ² éventuelles de corrosivité (pour les autorités qui utilisent des sous-catégories, y compris le règlement CLP)	Corrosives chez ≥ 1 sur 3 animaux	
		Exposition	Observation
Corrosive	Sous-catégorie corrosive 1A	≤ 3 minutes	≤ 1 heure
	Sous-catégorie corrosive 1B	> 3 minutes / ≤ 1 heures	≤ 14 jours
	Sous-catégorie corrosive 1C	> 1 heure / ≤ 4 heures	≤ 14 jours

7. La méthode de référence validée (7) comporte une limite par rapport à de nombreux produits chimiques non-corrosifs et certains produits chimiques corrosifs pour lesquels la méthode ne pourra pas s'appliquer, selon les résultats de l'essai de compatibilité initial (voir paragraphe 13). Les produits chimiques aqueux dont le pH est compris dans l'intervalle de 4,5 à 8,5, se prêtent rarement à l'essai; toutefois, 85 % des produits chimiques d'essai dans cet intervalle de pH n'étaient pas corrosifs dans les essais sur animaux (7). La méthode *in vitro* sur membrane d'étanchéité peut être utilisée pour tester des matières solides (solubles ou insolubles dans l'eau), des liquides (aqueux ou non

¹ «Dérivé acide» est une désignation de classe non spécifique et est largement défini comme un acide produit à partir d'une substance chimique directement ou par modification ou substitution partielle. Cette classe comprend les anhydrides, les acides halogénés, les sels et d'autres types de produits chimiques.

² Dans le cas de l'UE, le règlement CLP applique les trois sous-catégories de corrosion cutanée 1A, 1B et 1C.

aqueux) et des émulsions. Néanmoins, les produits chimiques d'essai qui ne provoquent pas de modifications détectables dans l'essai de compatibilité (c'est-à-dire un changement de couleur dans le système de détection chimique (CDS) du procédé d'essai de référence validé) ne peuvent être testés par la méthode sur membrane d'étanchéité et il faudra donc recourir à d'autres méthodes d'essais.

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Le système d'essai comporte deux éléments, une membrane biologique macromoléculaire synthétique et un CDS; le procédé d'essai est fondé sur la détection par le CDS de dommages provoqués par des produits chimiques d'essai corrosifs sur la membrane d'étanchéité après l'application du produit chimique d'essai sur la surface de la membrane d'étanchéité macromoléculaire synthétique (7), dommages vraisemblablement dus à un ou des mécanismes de corrosion similaire à ceux qui agissent sur la peau vivante.
9. Il convient de mesurer la pénétration de la membrane d'étanchéité (ou sa percée) par plusieurs protocoles ou CDS, en particulier un changement de couleur d'un colorant indicateur de pH ou d'une quelconque autre propriété de la solution indicatrice située sous la barrière.
10. La validité de la membrane d'étanchéité, c'est-à-dire sa pertinence et sa fiabilité, doit être déterminée pour l'utilisation prévue. Il faut ainsi s'assurer que les différentes préparations confèrent effectivement des propriétés d'étanchéité, par exemple, qu'elles sont capables de maintenir une barrière contre des produits chimiques non corrosifs, et aptes à classer des propriétés corrosives des produits chimiques en diverses sous-catégories de corrosivité du SGH de l'ONU (1). La classification attribuée dépend du temps nécessaire à un produit chimique pour pénétrer la membrane d'étanchéité jusqu'à la solution indicatrice.

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

11. Avant d'appliquer en routine la méthode *in vitro* sur membrane d'étanchéité, conformément à la présente méthode d'essai, les laboratoires doivent faire la preuve de leur compétence technique en classifiant correctement les douze produits énumérés au tableau 2. Dans le cas où une substance figurant dans le tableau 2 serait indisponible, où dans d'autres cas où il est justifié de la remplacer par une autre substance (par exemple à partir de la liste de substances de référence (10)), cette autre substance peut être utilisée si des données de référence appropriées *in vivo* et *in vitro* sont disponibles, et dans la mesure où les mêmes critères de sélection que ceux décrits sous le tableau 1 sont utilisés.

Tableau 2: Liste des produits chimiques d'épreuve de compétence¹

Produit chimique ¹	Numéro	Classe chimique ²	Sous-Cat. SGH de	Sous-Cat SGH de l'ONU

	CAS		l'ONU d'après les résultats <i>in vivo</i> ³	d'après les résultats <i>in vitro</i> ⁴
Trifluorure de bore dihydraté	13319-75-0	acide inorganique	1A	1A
Acide nitrique	7697-37-2	acide inorganique	1A	1A
Pentachlorure de phosphore	10026-13-8	Précurseur d'acide organique	1A	1A
Chlorure de valéryle	638-29-9	Chlorure d'acide	1B	1B
Hydroxyde de sodium	1310-73-2	Base inorganique	1B	1B
1-(2-Aminoéthyl) pipérazine	140-31-8	Amine aliphatique	1B	1B
Chlorure de benzène-sulfonyle	98-09-9	Chlorure d'acide	1C	1C
N,N-diméthyle benzylamine	103-83-3	Aniline	1C	1C
Tetraéthylène pentamine	112-57-2	Amine aliphatique	1C	1C
Eugénol	97-53-0	Phenol	NC	NC
Acrylate de nonyle	2664-55-3	Acrylate/méthacrylates	NC	NC
Bicarbonate de soude	144-55-8	Sel inorganique	NC	NC

¹La liste des douze produits chimiques présentée ci-dessus contient trois substances de chacune des trois sous-catégories du SGH pour les substances corrosives, et trois substances non corrosives, toutes disponibles dans le commerce; la sous-catégorisation selon de SGH de l'ONU se base sur des résultats *in vivo* de bonne qualité. Ces substances sont extraites de la liste de 40 substances de référence inclus dans la liste minimale des produits chimiques identifiés pour démontrer la précision et la fiabilité des méthodes d'essai de structure et de fonction similaires à la MRV, et ont été sélectionnées à partir de 163 produits chimiques de référence initialement utilisés pour la validation de la MRV (Corrositex ® (7) (10) (14). Le but de cette sélection était d'inclure, dans la mesure du possible, des substances qui: (i) sont représentatives de la gamme des réactions de corrosion provoquées (par exemple non corrosives; groupe d'emballage I, II, III de l'ONU) que les MRV sont capables de mesurer ou de prévoir; (ii) sont représentatives des classes chimiques utilisées dans les études de validation; (iii) ont une structure chimique bien définie; (iv) permettent d'obtenir des résultats reproductibles avec la MRV; (v) permettent d'obtenir des résultats définitifs avec la méthode d'essai *in vivo* de référence; (vi) sont disponibles dans le commerce et (vii) ne sont pas associées à des coûts d'élimination prohibitifs.

²Substances testées pures ou avec une pureté ≥90%.

³Les groupes d'emballage de l'ONU correspondants sont les groupes I, II et III respectivement pour les sous-catégories 1A, 1B et 1C du SGH de l'ONU.

NC; Non corrosif.

PROTOCOLE

12. Les paragraphes suivants proposent une description des composants et des protocoles d'un procédé d'essai sur membrane d'étanchéité artificielle pour l'évaluation de la corrosivité (7) (15), sur la base de la MRV, i.e. la méthode commercialement disponible Corrositex®. La membrane d'étanchéité et les solutions de compatibilité et indicatrices ainsi que les solutions permettant la catégorisation peuvent être produites, préparées ou obtenues dans le commerce, comme dans le cas de la MRV Corrositex®. Un exemple de protocole de procédé d'essai sur échantillon du procédé d'essai de référence validé est disponible (7). L'essai doit être effectué à température ambiante (17-25 °C) et les composants doivent se conformer aux critères suivants.

Essai de compatibilité du produit chimique d'essai

13. Avant de procéder à l'essai sur membrane d'étanchéité, un essai de compatibilité est mis en œuvre afin de déterminer si le produit chimique d'essai est détectable par le CDS. Si ce n'est pas le cas, le procédé d'essai sur membrane d'étanchéité ne convient pas à l'évaluation de la corrosivité potentielle de ce produit chimique d'essai particulier et il conviendra d'utiliser un autre procédé d'essai. Le CDS et les conditions d'exposition employés pour l'essai de compatibilité doivent reproduire l'exposition subie dans le futur essai sur membrane d'étanchéité.

Essai de catégorie d'échelle de temps du produit chimique d'essai

14. Si le procédé d'essai le permet, un produit chimique d'essai qualifié par l'essai de compatibilité peut également subir un essai de catégorie d'échelle de temps, c'est-à-dire un criblage permettant de distinguer entre acides ou bases faibles et forts. Par exemple, dans le procédé d'essai de référence validé, un essai de catégorie d'échelle de temps permet de définir l'une des deux échelles de temps à utiliser selon que l'on détecte une réserve acide ou alcaline significative (pouvoir tampon). Il convient d'utiliser deux échelles de temps de percée différentes pour déterminer la corrosivité et la sous-catégorie de corrosivité cutanée du SGH de l'ONU, en fonction de la réserve acide ou alcaline du produit chimique d'essai.

ÉLÉMENTS DU PROCÉDÉ D'ESSAI SUR MEMBRANE D'ÉTANCHÉITÉ

Membrane d'étanchéité

15. La membrane d'étanchéité comprend deux éléments:: un gel aqueux macromoléculaire protéique et une membrane de support perméable. Le gel protéique doit être étanche aux liquides et aux solides, mais susceptible d'être corrodé et perméabilisé. Il convient de stocker la membrane d'étanchéité terminée dans des conditions prédéfinies afin d'éviter la détérioration du gel, par exemple, par séchage, croissance microbienne, déplacement des couches, craquelures, qui pourraient nuire à ses performances. On déterminera une période de stockage acceptable et les préparations de membranes d'étanchéité ne seront plus utilisées au-delà.

16. La membrane de support perméable assure un soutien mécanique au gel protéique pendant le processus de gélification et l'exposition au produit chimique d'essai. La membrane de support doit prévenir tout affaissement ou déplacement du gel et être aisément perméable à tout produit chimique d'essai.
17. Le gel protéique, composé de protéines, par exemple, kératine, collagène ou mélanges de protéines qui forment une matrice de gel, sert de cible pour le produit chimique d'essai. Le matériau protéique est placé sur la surface de la membrane de support et se gélifie avant la pose de la membrane d'étanchéité sur la solution indicatrice. L'épaisseur et la densité du gel protéique doivent être uniformes, et le matériau doit être exempt de bulles d'air et de défauts qui pourraient affecter son intégrité fonctionnelle.

Système de détection chimique (CDS)

18. La solution indicatrice, identique à celle utilisée pour l'essai de compatibilité, doit répondre à la présence d'un produit chimique d'essai. On peut employer un colorant ou une combinaison de colorants indicateurs de pH, par exemple du rouge crésol et de l'orange méthyl, qui change de couleur en présence du produit chimique d'essai. Le système de mesure peut être visuel ou électronique.
19. Il convient d'évaluer la pertinence et la fiabilité des systèmes de détection développés pour détecter le passage du produit chimique testé à travers la membrane d'étanchéité afin de définir la gamme de produits chimiques d'essai susceptible d'être détecté et les limites quantitatives de détection.

MISE EN ŒUVRE DE L'ESSAI

Assemblage des éléments de la méthode d'essai

20. La membrane d'étanchéité est placée dans un flacon (ou un tube) contenant la solution indicatrice de telle sorte que la membrane support soit entièrement au contact de la solution indicatrice en l'absence de toute bulle d'air. On s'assurera du maintien de l'intégrité de la membrane.

Application du produit chimique d'essai

21. Une quantité appropriée du produit chimique d'essai, par exemple 500 µl d'un liquide ou 500 mg d'un solide finement pulvérisé (7), est soigneusement déposée sur la surface supérieure de la membrane d'étanchéité et uniformément répartie. Un nombre approprié de répliques, par exemple quatre (7), est préparé pour chaque produit chimique d'essai et ses témoins correspondants (voir paragraphes 23 à 25). La durée d'application du produit chimique d'essai à la membrane d'étanchéité est notée. Pour garantir un enregistrement précis des courtes durées de corrosion, les durées d'application du produit chimique d'essai dans les flacons des répliques sont échelonnées.

Mesure des pénétrations dans la membrane d'étanchéité

22. Chaque flacon est contrôlé de manière adéquate et le moment auquel intervient le premier changement dans la solution indicatrice, c'est-à-dire la pénétration de la membrane d'étanchéité, est noté, et la durée écoulée entre l'application et la pénétration de la membrane d'étanchéité déterminée.

Contrôles

23. Dans les essais qui requièrent l'utilisation d'un véhicule ou d'un solvant avec le produit chimique d'essai, ceux-ci doivent être compatibles avec le système de membrane d'étanchéité, c'est-à-dire ne pas nuire à l'intégrité du système de membrane d'étanchéité et ne pas modifier la corrosivité du produit chimique d'essai. Le cas échéant, un témoin de solvant (ou de véhicule) sera soumis à l'essai en même temps que le produit chimique testé afin de démontrer la compatibilité du solvant avec le système de membrane d'étanchéité.
24. Il convient également de soumettre simultanément à l'essai le produit chimique d'essai et un produit chimique témoin positif (corrosif) dont l'activité de corrosion est intermédiaire, par exemple, 110 ± 15 mg hydroxyde de sodium (sous-catégorie de corrosivité 1B du SGH de l'ONU) (7), afin de vérifier que les performances du système d'essai sont acceptables. Il peut être utile d'inclure un second témoin positif de même classe chimique que le produit chimique d'essai pour évaluer le potentiel de corrosivité relatif d'un produit chimique d'essai corrosif. On choisira un ou plusieurs témoins positifs de corrosivité intermédiaire (sous-catégorie 1B du SGH de l'ONU) de manière à déterminer des changements de durée de pénétration éventuellement trop longs ou trop courts par rapport à la valeur de référence établie, et qui signalent par conséquent un fonctionnement incorrect du système d'essai. A cette fin, les produits chimiques extrêmement corrosifs (sous-catégorie 1A du SGH de l'ONU) ou non corrosifs n'ont qu'une utilité limitée. Un produit chimique corrosif de sous-catégorie 1B du SGH de l'ONU doit permettre la détection d'une durée de percée trop courte ou trop longue. Il est possible d'employer un produit chimique faiblement corrosif (sous-catégorie 1C du SGH de l'ONU) comme témoin positif pour mesurer l'aptitude du procédé d'essai à distinguer systématiquement les produits chimiques faiblement corrosifs des produits chimiques non corrosifs. Quelle que soit l'approche utilisée, il est nécessaire de définir un intervalle acceptable de réponses des témoins positifs fondé sur l'intervalle historique des durées de percée du ou des témoins positifs employés, par exemple sous la forme moyenne ± 2 -3 écarts types. Dans chaque étude, il convient de déterminer la durée de percée exacte du témoin positif de manière à pouvoir détecter des écarts hors de l'intervalle acceptable.
25. On testera également un témoin négatif (non corrosif), par exemple acide citrique 10 %, acide propionique 6 % (7), parallèlement au produit chimique d'essai pour obtenir une mesure de contrôle de qualité supplémentaire démontrant l'intégrité fonctionnelle de la membrane d'étanchéité.

Critères d'acceptabilité de l'étude

26. Conformément aux paramètres de durée établis pour chaque sous-catégorie de corrosivité du SGH de l'ONU, la durée (en minutes) écoulée entre l'application du produit chimique d'essai sur la membrane d'étanchéité et la pénétration de la membrane est utilisée pour prédire la corrosivité du produit chimique d'essai. Pour qu'une étude soit jugée acceptable, le témoin positif correspondant doit donner la durée de réponse de pénétration attendue (par exemple 8-16 min. de temps de pénétration pour l'hydroxyde de soude si cette substance est utilisée comme témoin positif), le témoin négatif correspondant ne doit pas être corrosif et, le témoin de solvant correspondant éventuellement ne doit pas présenter de corrosivité ni altérer le potentiel de corrosivité du produit chimique d'essai. Avant d'introduire l'utilisation en routine d'une méthode conforme à la présente méthode d'essai, les laboratoires devront démontrer leur compétence technique à l'aide des 12 substances recommandées dans le tableau 2. Dans le cas des nouvelles méthodes similaires développées dans le cadre de cette méthode d'essai, qui sont structurellement et fonctionnellement similaires à la méthode de référence validée (14), les normes de performance pré-définies décrites seront utilisées pour démontrer la fiabilité et la précision de la nouvelle méthode avant son application aux essais réglementaires (10).

Interprétation des résultats et classification de corrosivité des produits chimiques d'essai

27. La durée (en minutes) écoulée entre l'application du produit chimique d'essai à la membrane d'étanchéité et la pénétration de la membrane est utilisée pour classer le produit chimique d'essai en sous-catégories de corrosivité selon le SGH de l'ONU (1) et, le cas échéant, dans un groupe d'emballage ONU (16). Les valeurs de durée limites de chacune des trois sous-catégories de corrosivité sont définies pour chaque procédé d'essai proposé. Les décisions ultimes d'établissement des durées limites seront adoptées en s'efforçant de limiter le plus possible la sous-classification du danger de corrosion (c'est-à-dire des faux négatifs). Dans la présente méthode d'essai, les temps limites de la méthode Corrositex® tels que décrits dans le tableau 3 doivent être utilisés car cette méthode est actuellement la seule qui relève de la ligne directrice (7).

Tableau 3: Modèle de prédiction de Corrositex®

Temps de pénétration moyen (min).		Prédiction selon le SGH de l'ONU ³
Produits chimiques d'essai de catégorie 1 ¹ (déterminée par le test de catégorisation de la méthode)	Produits chimiques d'essai de catégorie 2 ² (déterminée par le test de catégorisation de la méthode)	
0-3 min.	0-3 min.	Corrosif, sous-catégorie 1A optionnelle

> 3 à 60 min.	> 3 à 30 min.	Corrosif, sous-catégorie 1B optionnelle
> 60 à 240 min.	> 30 à 60 min.	Corrosif, sous-catégorie 1C optionnelle
> 240 min.	> 60 min.	Non corrosif

¹ Produit chimique d'essai possédant une forte réserve acide ou alcaline (6).

² Produit chimique d'essai possédant une faible réserve acide ou alcaline (6).

³ Sous-catégories 1A, 1B, 1C du SGH de l'ONU correspondant respectivement aux groupes d'emballage I, II et III.

RÉSULTATS ET RAPPORTS

Résultats

28. La durée (en minutes) écoulée entre l'application et la pénétration de la membrane par le produit chimique d'essai et le ou les témoins positifs est rapportée sous forme de tableaux contenant les résultats individuels de chaque réplique et la moyenne $\pm$ écart type pour chaque essai.

Rapport d'essai

29. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

Produit chimique d'essai et substances témoins:

- Identification chimique: désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent;
- Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;
- Apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le DMSO et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles;
- Source et numéro de lot si disponible;
- Traitement du produit chimique d'essai ou de la substance témoin avant la conduite de l'essai, s'il y a lieu (par exemple chauffage, broyage);
- Stabilité du produit chimique d'essai, date de péremption, ou date de vérification analytique si disponible;
- Conditions de stockage .

Véhicule:

- Identification, concentration (s'il y a lieu), volume utilisé;
- Justification pour le choix du véhicule.

Modèle de membrane d'étanchéité in vitro et protocole utilisés, y compris précision et fiabilité démontrées

Conditions d'essais:

- description de l'appareil et des protocoles de préparation utilisés;
- source et composition de la membrane d'étanchéité *in vitro* utilisée;
- composition et propriétés de la solution indicatrice;
- méthode de détection;
- quantités de produit chimique d'essai et de substances témoins;
- nombre de répliques;
- description et justification de l'essai de catégorisation d'échelle de temps;
- méthode d'application;
- durées d'observation.
- description de l'évaluation de des critères de classification appliqués;
- démonstration de la compétence dans la mise en œuvre de la méthode d'essai avant son utilisation routinière au moyen des substances d'épreuve de compétence.

Résultats:

- présentation sous forme de tableau des données brutes individuelles issues de chaque échantillon d'essai et de contrôle individuel pour chaque réplique;
- descriptions des autres effets observés;
- classification obtenue en lien avec le modèle prédictif/les critères de décision employés.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Nations Unies (UN). (2013). Système Général Harmonisé de Classification et d'Étiquetage des Produits Chimiques (SGH), Première Edition Révisée, UN New York et Genève. Disponible à l'adresse: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html.
- (2) Chapitre B.4 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur la peau.
- (3) Chapitre B.40 *bis* de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai sur modèle de peau humaine (RHE).
- (4) Chapitre 40 de la présente annexe, Corrosion cutanée in vitro: essai de résistance électrique transcutanée (RET).
- (5) OCDE (2015). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (N° 203). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.
- (7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)
- (8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.
- (9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (N° 34).
- (10) OCDE (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. Disponible à l'adresse: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf>.

- (11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispira, Italy. ATLA 29, 96-97.
- (12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.
- (13) Chapitre B.46 de la présente annexe, Irritation cutanée in vitro: essai sur épiderme humain reconstitué. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Disponible à l'adresse: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.
- (14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Disponible à l'adresse: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf>.
- (15) Nations Unies (UN) (2013). Recommandations relatives au transport des marchandises dangereuses des Nations unies, règlements types, 18e édition révisée (Partie, Chapitre 2.8), Nations Unies, 2013.. Disponible à l'adresse : http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/unrec/rev18/English/Rev18_Volume1_Part2.pdf.

Appendice

DÉFINITIONS

Corrosion cutanée *in vivo*: survenue de lésions irréversibles de la peau. En l'occurrence, il s'agit de nécrose visible, à travers l'épiderme et jusque dans le derme, suite à l'application d'une substance d'essai pendant une durée allant jusqu'à quatre heures. Les réactions corrosives se traduisent généralement par des ulcères, des saignements, des croûtes sanguinolentes et, à la fin de la période d'observation, soit à 14 jours, par une décoloration due au blanchissement de la peau, des zones complètes d'alopécie, et des cicatrices. Un examen histopathologique peut être envisagé pour évaluer les lésions sujettes à questionnement.

Concordance: mesure de la performance des méthodes d'essai produisant des résultats relatifs à des catégories. Elle constitue un des aspects de la pertinence.. Ce terme est parfois utilisé indifféremment à la place de «précision», et se définit comme la proportion de tous les produits chimiques d'essai qui ont été correctement classés comme positifs ou négatifs.

La concordance dépend étroitement de la prévalence des résultats positifs dans les types de produits chimiques d'essai (9).

Fiabilité: Mesure de la reproductibilité de l'essai mis en œuvre, au sein d'un laboratoire et entre des laboratoires, au cours du temps, en utilisant le même mode opératoire. Elle est évaluée par calcul de la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires et de la répétabilité intra-laboratoire (9).

IATA: Approches Intégrées d'Essai et d'Evaluation.

Mélange: mélange ou solution composés de deux substances ou plus.

Normes de performance: Normes, basées sur un procédé d'essai validé, pour l'évaluation de la comparabilité d'un procédé d'essai proposé similaire en termes de propriétés mécanistiques et fonctionnelles. Sont inclus dans ces normes (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai; (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi les produits chimiques utilisés pour démontrer la performance correcte du procédé d'essai validé; et (iii) des 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 (9).

NC: non corrosif.

Pertinence: Description de la relation entre l'essai et l'effet étudié, et détermination de son adéquation et de son utilité dans un objectif particulier. 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'un procédé d'essai (9).

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé

suivant la présente méthode d'essai.

Précision: conformité entre les résultats d'une méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de la performance de la méthode et 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 (9).

Système de détection chimique (CDS): Système de mesure visuelle ou électronique employant une solution indicatrice qui répond en présence d'un produit chimique d'essai, par exemple, par une modification d'un colorant indicateur de pH, ou d'une combinaison de ces colorants, qui change de couleur en réponse à la présence d'un produit chimique d'essai, ou par d'autres types de réactions chimiques ou électrochimiques.

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques): système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, la communication des éléments d'information correspondants, par exemple, des pictogrammes, des mentions d'avertissement, des mentions de danger, conseils de prudence et des fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, les employés, les transporteurs, les consommateurs et les personnels des services d'urgence) ainsi que l'environnement (1).

Sensibilité: Proportion des substances positives (et actives) correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai qui produit des résultats relatifs aux catégories, et c'est un paramètre qu'il importe prendre en considération lors de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai (9).

Spécificité: Proportion des substances négatives (ou inactives) correctement classées par l'essai. Il s'agit d'une mesure de la précision d'une méthode d'essai qui produit des résultats relatifs aux catégories, et c'est un paramètre qu'il importe de prendre en considération lors de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai.

Substance: 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, à l'exclusion de tout solvant pouvant être séparé de la substance sans affecter sa stabilité ni modifier sa composition.

Substance mono-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un des constituants principaux est présent à hauteur d'au moins 80% (m/m).

Substance multi-constituant: une substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant figure à une concentration supérieure ou égale à 10% (m/m) and inférieure ou égale à 80% (m/m). Une substance multi-constituant est le résultat d'un processus de manufacture. La différence entre un mélange et une substance multi-constituant est que le mélange est obtenu en mélangeant deux substances ou plus sans que celles-ci réagissent entre elles. Une substance multi-constituant est le résultat d'une réaction chimique.

UVCB: Substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matières biologiques.

B.66 ESSAIS *IN VITRO* DE TRANSACTIVATION PAR TRANSFECTION STABLE VISANT LA DÉTECTION DES SUBSTANCES AGONISTES ET ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Ligne directrice d'essai de l'OCDE axée sur la performance

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 455 (2016) de l'OCDE. La ligne directrice 455 pour les essais de produits chimiques est axée sur la performance (LDAP) et 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 essais 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 nouveaux essais similaires ou modifiés, 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 de référence totalement validées (appendices 2 et 3) qui sont à la base de la présente méthode d'essai axée sur la performance sont les suivantes:
 - 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

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 la détection des produits chimiques oestrogéniques et anti-oestrogéniques.

validation d'essais similaires visant le même danger/effet, et elles permettent de modifier la LDAP 455 en temps utile par l'ajout de nouveaux essais similaires. Toutefois, l'ajout de tels nouveaux essais similaires n'est possible qu'après examen et vérification, par l'OCDE, du respect des normes de performance. Les essais inclus dans la ligne directrice 455 peuvent être utilisés, sans discrimination, pour répondre aux exigences des pays membres de l'OCDE en matière d'essai de TA ER, dans le cadre du système d'Acceptation mutuelle de données de l'OCDE.

Contexte et principes des essais inclus dans la présente méthode d'essai

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 la détection et les essais de produits chimiques 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 de l'OCDE 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 la présente méthode d'essai correspondent au niveau 2, qui couvre «les essais *in vitro* fournissant des données sur certains mécanismes et voies d'activité endocrinienne». La présente méthode d'essai concerne les essais *in vitro* de transactivation (TA) conçus 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 (ontogenèse) 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 essais 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 essais STTA et VM7Luc (2).
6. Les définitions et abréviations utilisées dans la présente méthode d'essai sont présentées à l'appendice 1.

Portée et limites des essais de transactivation

7. Ces essais sont proposés à des fins de criblage et de priorisation, mais ils 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. Ils 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. Aucun des essais relevant de la présente méthode d'essai ne porte sur ces modes d'action.

9. La présente méthode d'essai 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 dans les essais étudiés ici à un essai de liaison aux ER, avant de pouvoir conclure qu'ils ne se lient pas aux récepteurs. En outre, ces essais ne livrent 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, des substances UVCB et des mélanges. Avant d'utiliser la méthode d'essai sur une substance multi-constituants, une substance UVCB ou un mélange en vue de générer des données à des fins réglementaires, il convient d'examiner si, et le cas échéant pourquoi, ladite méthode peut fournir des résultats adéquats aux fins visées. Ces questions ne se posent pas quand la réglementation exige de réaliser l'essai sur le mélange.
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 méthode d'essai. 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 utérotropiques (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 méthode d'essai. 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), appendice 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	TP ₁₀ (M)	TP ₅₀ ^b (M)
1	17-β-œstradiol ^a	50-28-2	Pos	$<1,00 \times 10^{-11}$	$<1,00 \times 10^{-11}$	Pos	$5,63 \times 10^{-12}$	Pos (227/227)	Pos	Pos
2	17-α œstradiol ^a	57-91-0	Pos	$7,24 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	Pos	$1,40 \times 10^{-9}$	Pos(11/11)	Pos	Pos
3	17-α-éthinyloestradiol ^a	57-63-6	Pos	$<1,00 \times 10^{-11}$	$<1,00 \times 10^{-11}$	Pos	$7,31 \times 10^{-12}$	Pos(22/22)	Pos	Pos
4	17-β-trenbolone	10161-33-8	Pos	$1,78 \times 10^{-8}$	$2,73 \times 10^{-7}$	Pos	$4,20 \times 10^{-8}$	Pos (2/2)	NT	NT
5	19-nortestostérone ^a	434-22-0	Pos	$9,64 \times 10^{-9}$	$2,71 \times 10^{-7}$	Pos	$1,80 \times 10^{-6}$	Pos(4/4)	Pos	Pos
6	4-cumylphénol ^a	599-64-4	Pos	$1,49 \times 10^{-7}$	$1,60 \times 10^{-6}$	Pos	$3,20 \times 10^{-7}$	Pos(5/5)	Pos	NT
7	4-tert-octylphénol ^a	140-66-9	Pos	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	Pos	$3,19 \times 10^{-8}$	Pos(21/24)	Pos	Pos
8	Apigénine ^a	520-36-5	Pos	$1,31 \times 10^{-7}$	$5,71 \times 10^{-7}$	Pos	$1,60 \times 10^{-6}$	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	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	Pos	$5,33 \times 10^{-7}$	Pos(65/65)	Pos	Pos
11	Bisphénol B ^a	77-40-7	Pos	$2,36 \times 10^{-8}$	$2,11 \times 10^{-7}$	Pos	$1,95 \times 10^{-7}$	Pos(6/6)	Pos	Pos
12	Phtalate de butyle et de	85-68-7	Pos	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	Pos	$1,98 \times 10^{-6}$	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	$1,23 \times 10^{-9}$	$2,00 \times 10^{-8}$	Pos	$1,32 \times 10^{-7}$	Pos(30/30)	Pos	NT
15	Daidzéine ^a	486-66-8	Pos	$1,76 \times 10^{-8}$	$1,51 \times 10^{-7}$	Pos	$7,95 \times 10^{-7}$	Pos(39/39)	Pos	Pos
16	Diéthylstilbestrol ^a	56-53-1	Pos	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	Pos	$3,34 \times 10^{-11}$	Pos(42/42)	Pos	NT
17	Phtalate de dibutyle	84-74-2	Pos	$4,09 \times 10^{-6}$		Pos	$4,09 \times 10^{-6}$	Pos(6/11)	Pos	Nég
18	Éthylparaben	120-47-8	Pos	$5,00 \times 10^{-6}$	(pas de TP50)	Pos	$2,48 \times 10^{-5}$	Pos		NT
19	Œstrone ^a	53-16-7	Pos	$3,02 \times 10^{-11}$	$5,88 \times 10^{-10}$	Pos	$2,34 \times 10^{-10}$	Pos(26/28)	Pos	Pos
20	Génistéine ^a	446-72-0	Pos	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	Pos	$2,71 \times 10^{-7}$	Pos(100/102)	Pos	Pos
21	Halopéridol	52-86-8	Nég	-	-	Nég	-	Nég (2/2)	Nég	NT
22	Kaempférol ^a	520-18-3	Pos	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	Pos	$3,99 \times 10^{-6}$	Pos(23/23)	Pos	NT
23	Képone ^a	143-50-0	Pos	$7,11 \times 10^{-7}$	$7,68 \times 10^{-6}$	Pos	$4,91 \times 10^{-7}$	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	méso-hexestrol ^a	84-16-2	Pos	$<1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	Pos	$1,65 \times 10^{-11}$	Pos(4/4)	Pos	NT
27	Méthyltestostérone ^a	58-18-4	Pos	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	Pos	$2,68 \times 10^{-6}$	Pos(5/6)	Pos	NT
28	Morine	480-16-0	Pos	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	Pos	$2,37 \times 10^{-6}$	Pos(2/2)	Pos	NT
29	Noréthynodrel ^a	68-23-5	Pos	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	Pos	$9,39 \times 10^{-10}$	Pos(5/5)	Pos	NT
30	p,p'-méthoxychlore ^a	72-43-5	Pos	$1,23 \times 10^{-6}$	(pas de TP ₅₀) ^b	Pos	$1,92 \times 10^{-6}$	Pos(24/27)	Pos	Pos
31	Phénobarbital ^a	57-30-7	Nég	-	-	Nég	-	Nég(2/2)	Nég	NT
32	Réserpine	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	$2,82 \times 10^{-8}$	$9,78 \times 10^{-6}$	Pos	$1,75 \times 10^{-5}$	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 essais inclus dans la présente méthode d'essai n'utilisent pas tous 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.	$3,97 \times 10^{-9}$	Pos.	$2,08 \times 10^{-7}$	Pos. modéré	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.	$5,61 \times 10^{-6}$	Nég.	-	faiblement Pos.	Nég.	Stéroïde	Produit pharmaceutique
4	Raloxifène HCl	82640-04-8	Pos.	$7,86 \times 10^{-10}$	Pos.	$1,19 \times 10^{-9}$	Pos. modéré	Pos.	Hydrocarbure (Cyclique)	Produit pharmaceutique
5	Tamoxifène	10540-29-1	Pos.	$4,91 \times 10^{-7}$	Pos.	$8,17 \times 10^{-7}$	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 (Cyclique)	Produit naturel

Abréviations: N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service; M = molaire; CI₅₀ = 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 x 10⁻³ M (STTA) et 1 x 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 CI₅₀ 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 utérutrophique 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 L'ESSAI DE TA ER

Éléments essentiels de l'essai

11. La présente méthode d'essai s'applique aux essais 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 essais visés.

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 l'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 par l'un des essais relevant de la présente méthode d'essai, il convient que chaque laboratoire démontre sa capacité à mettre en œuvre l'essai. Pour démontrer cette capacité, 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 aux essais. 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 épreuves agonistes indépendantes (par exemple 17 β -estradiol) et 10 épreuves antagonistes indépendantes (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.	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique et vétérinaire
12	17 α -œstradiol	57-91-0	Pos.	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
15	méso-hexestrol	84-16-2	Pos.	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
11	4-tert-octylphénol	140-66-9	Pos.	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	Phénol	Intermédiaire chimique
9	Génistéine	446-72-0	Pos.	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	Flavonoïde, composé hétérocyclique	Produit naturel et pharmaceutique
6	Bisphénol A	80-05-7	Pos.	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	Phénol	Intermédiaire chimique
2	Kaempférol	520-18-3	Pos.	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,99 \times 10^{-6}$	$3,49 \times 10^{-3}$	Flavonoïde, composé hétérocyclique	Produit naturel
3	Phtalate de butyle et de benzyle	85-68-7	Pos.	$1,14 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-4}$	Acide carboxylique, ester, acide phtalique	Plastifiant, produit chimique industriel
	p,p'-méthoxychlore	72-43-5	Pos.	$1,23 \times 10^{-6}$	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-6}$	$2,89 \times 10^{-3}$	Hydrocarbure	Pesticide, produit

4									(halogéné)	vétérinaire
1	Éthylparaben	120-47-8	Pos.	$5,00 \times 10^{-6}$	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,48 \times 10^{-5}$	$6,02 \times 10^{-3}$	Acide carboxylique, phénol	Produit pharmaceutique, conservateur
17	Atrazine	1912-24-9	Nég.	-	-	$10^{-10} - 10^{-4}$	-	$4,64 \times 10^{-4}$	Composé hétérocyclique	Herbicide
20	Spironolactone	52-01-7	Nég.	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	$2,40 \times 10^{-3}$	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.	-	-	$10^{-11} - 10^{-5}$	-	$1,64 \times 10^{-3}$	Composé hétérocyclique, indole	Produit pharmaceutique et vétérinaire

Abbreviations: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number; EC50 = half maximal effective concentration of test substance; NÉG = Négative; POS = Positive;

PC10 (and PC50) = the concentration of a test substance at which the response is 10% (or 50 % for PC50) of the response induced by the Positive control (E2, 1nM) in each plate.

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 comparables, 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.	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	Pos.	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	Pos. modéré	Pos.	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique
2	Raloxifène HCl	82640-04-8	Pos.	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	Pos.	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	Pos. modéré	Pos.	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique
3	Tamoxifène	10540-29-1	Pos.	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} - 10^{-5}$	Pos.	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	Pos.	Pos.	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique
4	17β-estradiol	50-28-2	Nég.	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	Nég.	-	$3,67 \times 10^{-3}$	Nég.*	PN	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
5	Apigénine	520-36-5	Nég.	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	Nég.	-	$3,70 \times 10^{-4}$	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.	-	$3,59 \times 10^{-3}$	Nég.	Nég.	Ester, acide phtalique	Ingrédient cosmétique, produit chimique industriel, plastifiant
7	Flavone	525-82-6	Nég.	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	Nég.	-	$4,50 \times 10^{-4}$	Nég.*	PN	Flavonoïde, composé hétérocyclique	Produit naturel, produit pharmaceutique

8	Génistéine	446-72-0	Nég.	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	Nég.	-	$3,70 \times 10^{-4}$	Nég.*	Nég.	Flavonoïde, composé hétérocyclique	Produit naturel, produit pharmaceutique
9	p-n-nonylphénol	104-40-5	Nég.	-	$10^{-9} - 10^{-4}$	Nég.	-	$4,54 \times 10^{-4}$	non testé	Nég.	Phénol	Intermédiaire chimique
10	Resvératrol	501-36-0	Nég.	-	$10^{-8} - 10^{-3}$	Nég.	-	$4,38 \times 10^{-4}$	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).

¹Valeurs 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 Mean IC_{50} values were calculated with values reported by the laboratories of the VM7Luc ER TA validation study (XDS, ECVAM, and 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'épreuve

16. L'acceptation ou le rejet d'une épreuve 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 l'essai choisi (pour l'essai de STTA voir l'appendice 2, pour l'essai de TA ER VM7Luc voir l'appendice 3), et que tous les témoins positifs et négatifs soient classés correctement par les expérimentations acceptées. Un laboratoire prouve sa compétence à répéter un 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 essais, par rapport à la réponse du véhicule (solvant) témoin, afin de garantir une sensibilité adéquate. S'agissant des 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 essai.

18. Le respect des critères d'acceptabilité (paragraphe 16) indique que l'essai fonctionne correctement, mais ne garantit pas que chaque épreuve lancée fournira des données exactes. La réplication des résultats de la première épreuve constitue la meilleure indication que les valeurs obtenues sont exactes. Si deux épreuves donnent des résultats reproductibles (par ex. si elles concluent toutes les deux que le produit chimique d'essai est positif), il n'est pas nécessaire d'en réaliser une troisième.

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

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, RTPMax, CI50 etc.).

Rapport d'essai

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

Essai:

- essai employé.
- 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.

Solvent/Vehicule:

- 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;
- standards de référence positif et négatif;

- 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 l'essai concerné eu égard aux données historiques des témoins;
- valeurs réelles des $\log CE_{50}$, $\log TP_{50}$, $\log IC_{50}$ 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} , TP_{50} , IC_{50} et/ou CE_{50} , 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) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 34.), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (2) OCDE (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), de coopération et de développement économiques, 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. 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 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). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 173.), de coopération et de développement économiques, Paris.
- (7) OCDE (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 (N° 174.), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (8) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and

Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150.), Organisation de coopération et de développement économiques, 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. and 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.
- (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.
- (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. and 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. and 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 (N° 03-4505.).

- (32) 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.
- (33) 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.
- (34) 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.
- (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.

Appendice 1

DÉFINITIONS AND 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 méthode d'essai.

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 un 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 dextrane)

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

DMSO: diméthylsulfoxyde

E2: 17 β -œstradiol

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

Épreuve indépendante: expérimentation isolée indépendante, qui évalue l'action d'un produit chimique sur l'aspect biologique de l'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.

Étude: La gamme complète du travail expérimental réalisé pour évaluer une substance unique spécifique, au moyen d'un essai spécifique. Une étude comprend toutes les étapes incluant les essais de dilution de la substance d'essai dans le milieu d'essai, les épreuves préliminaires de détermination des concentrations, toutes les épreuves complètes 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 l'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: dans le contexte de la présente méthode d'essai, un essai est une des méthodologies acceptées comme valide puisqu'elle remplit les critères de performance décrits. Les éléments de l'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.

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'un 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'un 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

EFM: Estrogen-free medium. Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 4.5% charcoal/dextran-treated FBS, 1.9% L-glutamine, and 0.9% Pen-Strep.

ER: Estrogen receptor (récepteur des œstrogènes)

ERE: Estrogen response element (élément de réponse des œstrogènes)

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, essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Synonyme de «méthode d'essai similaire».

Méthodes d'essai de référence: les essais sur lesquels repose la ligne directrice 455.

Méthode d'essai validée: 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) complété 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 un essai validé, permettant d'évaluer la comparabilité d'un essai proposé structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: (1) les éléments essentiels de l'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 l'essai proposé 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'un essai (1).

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

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

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'un essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'un 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'un essai produisant des résultats catégoriels, et d'un élément important à prendre en considération pour évaluer la pertinence d'un essai (1).

Substance: au sens du règlement REACH¹², une substance 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 leur stabilité 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. Une définition très similaire est utilisée par le SGH des Nations Unies (1).

Substances d'épreuve de compétence: sous-catégorie des substances de référence indiquées 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): 17β-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.

¹² Règlement (CE) n° 1907/2006 du Parlement européen et du Conseil du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n° 793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission.

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 transfecter 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, d'un essai 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

Appendice 2

ESSAI DE TRANSACTIVATION FAISANT INTERVENIR LE RECEPTEUR DES ŒSTROGENES HUMAIN TRANSFECTE DE FAÇON STABLE POUR LA DETECTION DE L'ACTIVITE ŒSTROGENIQUE AGONISTE ET ANTAGONISTE DES SUBSTANCES CHIMIQUES A L'AIDE DE LA LIGNEE CELLULAIRE HERA-HELA-9903

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES (VOIR AUSSI INTRODUCTION GÉNÉRALE)

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. Cet essai est conçu 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 ([appendice1](#)).
3. Il convient de consulter l'«**INTRODUCTION GÉNÉRALE**» et les«**ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE LA TA ER**» avant de mettre en œuvre le présent essai à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont indiquées à l'appendice 2.1

PRINCIPE DE L'ESSAI (VOIR AUSSI INTRODUCTION GÉNÉRALE)

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)¹³ après signature d'un accord de transfert de matériel.

¹³ JCRB Cell Bank : National Institute of Biomedical Innovation

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 -oestradiol, 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 épreuve. 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 $\pm$ 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 $\pm$ 1 °C pendant 3 heures avant l'exposition au produit chimique. Le matériel en plastique est exempt de toute activité oestrogénique.
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 2.2, 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 -oestradiol), 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 - oestradiol (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 -oestradiol 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 CI_{50} 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 CI_{50} . 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	Log CI_{50}	Plage d'essai
Tamoxifène No CAS: 10540-29-1	Positif: CI_{50} devra être calculée	-5,942 ~ -7,596	$10^{-10} \sim 10^{-5}M$
Flutamide No CAS: 13311-84-7	Négatif: CI_{30} ne devra pas être calculée	-	$10^{-10} \sim 10^{-5}M$

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 μ M 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 TP_{10} 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 TP_{10} 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 de 1 μ M de 4-hydroxytamoxifène (OHT) soit inférieure à 40.6% et l'ATR de 100 μ M de digitonine (Dig) soit inférieure à 0%

Démonstration de la compétence du laboratoire (voir paragraphe 14 et tableaux 3 et 4 de la section«ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER» de la présente méthode d'essai).

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 épreuves 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'épreuve est répétée 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 déposé 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 de produit chimique d'essai dans le solvant pour obtenir 500 µl de milieu.

Étape 3: exposition des cellules au produit chimique: ajouter 50 µl de la dilution dans le milieu (préparé 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 comme indiqué 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 épreuve (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

	Tamoxifèn	Flutamide	Produit chimique d'essai	Produit chimique d'essai 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	conc 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
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 μ M OHT	→	→	100 μ M 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 épreuve. 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 hER α -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 μ M OHT et des puits contenant 100 μ M 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 μ M)	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
B	conc 2 (1 μ M)	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
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 (par exemple, 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 (par exemple, 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. 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.

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

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

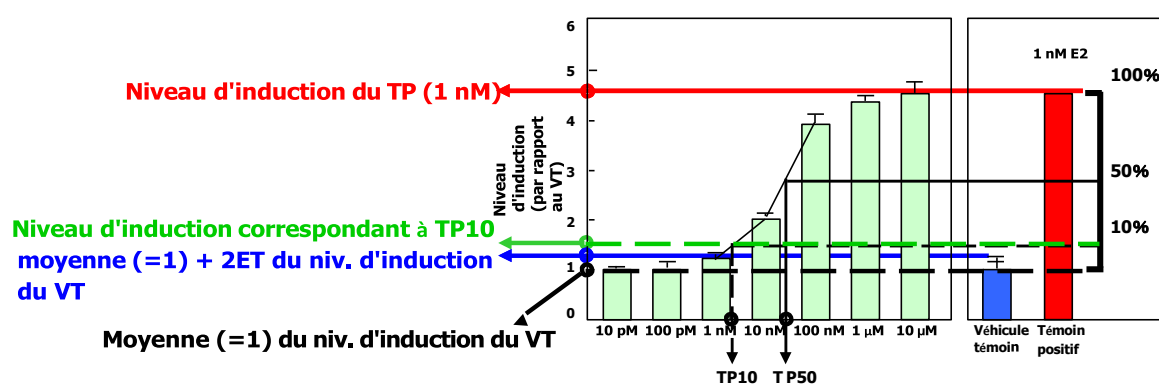
pour les produits chimiques positifs, les concentrations correspondant à la TP₁₀ et, le cas échéant, la TP₅₀.

37. 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 (a,b) et (c,d), la valeur TP_x peut être calculée à l'aide de l'équation suivante:

$$\log[TP_x] = \log[c] + (x - d) / (d - b)$$

38. 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

39. 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 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 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.

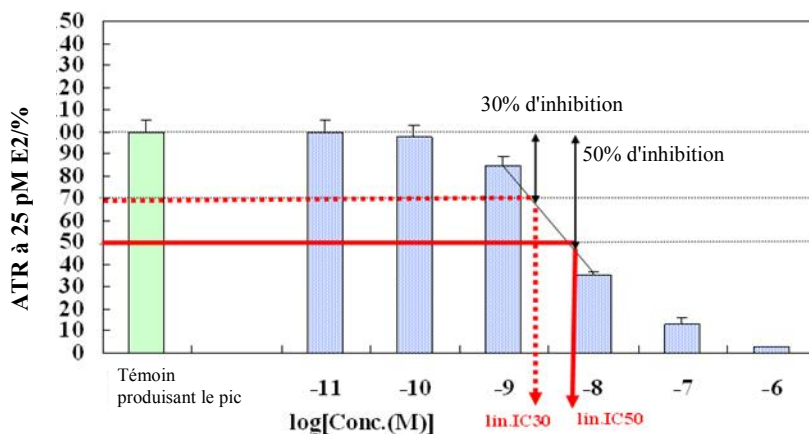
Étape 5. Calculer la valeur moyenne de l'activité transcriptionnelle relative pour chaque groupe de concentration.

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

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

42. Les résultats s'appuient sur deux (ou trois) épreuves indépendantes. Si deux épreuves livrent des résultats comparables et par conséquent reproductibles, une troisième épreuve 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);
- soient 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 épreuves sur trois.
Négatif	Si la RTP_{Max} obtenue demeure inférieure à 10 % de la réponse du témoin positif dans deux épreuves sur deux, ou deux épreuves 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 épreuves sur trois.
Négatif	Si on ne peut pas calculer la CI_{30} dans deux épreuves sur deux, ou deux épreuves sur trois.

43. 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 épreuves sur trois, mais elle sera jugée négative si la RTP_{Max} demeure inférieure à 10 % de la réponse du TP dans deux épreuves sur deux, ou deux épreuves sur trois.
44. 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'OCDE¹.
45. 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 %.
46. Le respect des critères d'acceptabilité indique que le système d'essai fonctionne correctement, mais ne garantit pas que chaque épreuve fournisse des données exactes. La duplication des résultats obtenus lors de la première épreuve constitue la meilleure assurance que les valeurs obtenues sont correctes (voir paragraphes 44 et 45).
47. 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 observée est due exclusivement à la réponse médiée par ER α peut être obtenue à l'aide d'un antagoniste ER α (voir appendice 2.1).

¹ [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]

RAPPORT D'ESSAI

48. Voir le paragraphe 20 de la section «ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER».

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (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 (N° 225), Organisation de coopération et de développement économiques, 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- 71.
- (6) Dussurget O. and 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. and 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 2.1

FAUX POSITIFS: EVALUATION DES SIGNAUX DE LUMINESCENCE NON MEDIÉS PAR LES RECEPTEURS

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).

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.

Analyse des données

Vérifier les critères d'acceptabilité.

Vérifier le VT 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 2.2

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.

APPENDICE 3

ESSAI DE TRANSACTIVATION FAISANT APPEL AU RECEPTEUR D'ŒSTROGENE VM7LUC POUR IDENTIFIER LES SUBSTANCES CHIMIQUES PRESENTANT UNE ACTIVITE ŒSTROGENIQUE AGONISTE ET ANTAGONISTE

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES (Voir aussi l'INTRODUCTION GÉNÉRALE)

1. Cet essai fait appel à la lignée cellulaire VM7Luc4E2¹. 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 minime 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 l'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.

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) (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 la détection des produits chimiques oestrogéniques et anti-oestrogéniques

3. Cet essai est conçu 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 phytoestrogènes 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 phytoestrogènes ou de composés similaires suspectés d'induire une suractivation du gène rapporteur luciférase par un mécanisme proche de celui des phytoestrogènes soit examinée attentivement dans les systèmes d'essai de TA par ER transfecté de façon stable (voir appendice 2)
4. Il convient de consulter l'«**INTRODUCTION GÉNÉRALE**» et les«**ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER**» avant de mettre en œuvre le présent essai à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont indiquées à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI (VOIR AUSSI L'INTRODUCTION GÉNÉRALE)

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)¹, et de Xenobiotic Detection Systems Inc. à Durham (Caroline du Nord, États-Unis)².

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.

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

¹ 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

² 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

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 ($1,84 \times 10^{-10}$, $4,59 \times 10^{-11}$, $1,15 \times 10^{-11}$ et $2,87 \times 10^{-12}$ 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 $3,67 \times 10^{-10}$ à $3,59 \times 10^{-13}$ 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 ($3,06 \times 10^{-9}$, $7,67 \times 10^{-10}$ et $1,92 \times 10^{-10}$ M) avec une concentration constante de E2 ($9,18 \times 10^{-11}$ 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 $2,45 \times 10^{-8}$ à $9,57 \times 10^{-11}$ M) avec E2 à concentration constante ($9,18 \times 10^{-11}$ 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 $9,06 \times 10^{-6}$ 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 $3,36 \times 10^{-6}$ M et de E2 à $9,18 \times 10^{-11}$ M dans du MSO.

Témoin E2 (essai de l'effet antagoniste uniquement)

19. Le témoin E2 est une solution de E2 à $9,18 \times 10^{-11}$ 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 de la rubrique «ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER» de la présente méthode d'essai).

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 dissous 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 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 (2×10^5 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 réplicats du témoin DMSO.
- L'essai préliminaire pour l'effet antagoniste requiert trois concentrations du mélange Ral/E2 (où E2 reste constant à $9,18 \times 10^{-11}$ 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 µl. 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 dilutions 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 dilutions 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 ($9,06 \times 10^{-6}$ M).
 - L'essai complet de l'effet *antagoniste* requiert neuf concentrations du mélange Ral/E2 (où E2 reste constant à $9,18 \times 10^{-11}$ M) en duplicat, en tant qu'étalon de référence, quatre réplicats du témoin E2 à $9,18 \times 10^{-11}$ M, quatre réplicats du témoin DMSO, et quatre réplicats du tamoxifène à $3,36 \times 10^{-6}$ 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 ($9,18 \times 10^{-11}$ 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 CE₅₀ et de la CI₅₀

34. La CE₅₀ (concentration efficace du produit chimique d'essai correspondant à la moitié de la réponse maximale [effet agoniste]) et la CI₅₀ (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 (CI₅₀ ou CE₅₀) 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:

$$Y = Base + \frac{(Sommet - Base)}{1 + 10^{(logCE_{50} - X) \text{ pente de Hill}}}$$

Où:

Y = réponse (en RLU);

X = logarithme de la concentration;

Base = réponse minimale;

Sommet = réponse maximale;

logCE₅₀ (ou logCI₅₀) = logarithme de la concentration correspondant à la réponse située à mi-chemin entre la base et le sommet;

pente de Hill = 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 CI₅₀ et de la CE₅₀. Le calcul de la CE₅₀ et de la CI₅₀ 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 l'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 le présent 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

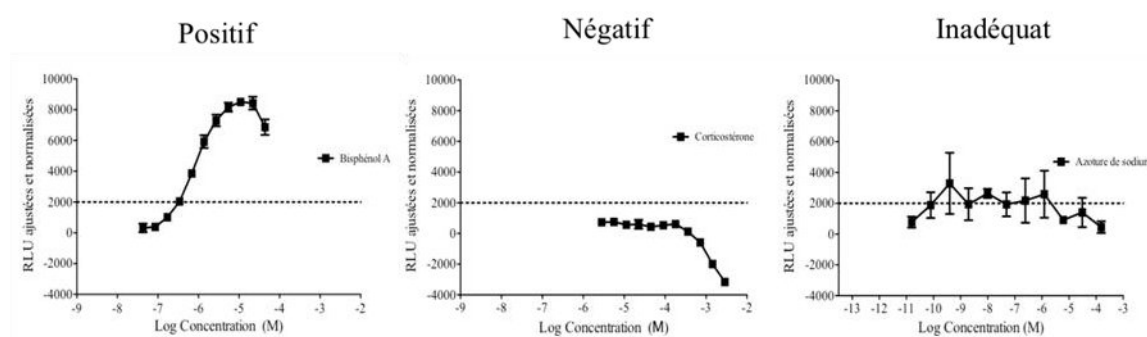
ACTIVITÉ AGONISTE

Positif	– 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 classé 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	– 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 $1,0 \times 10^{-5}$ M.

Inadéquat	Les données jugées non valides 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.

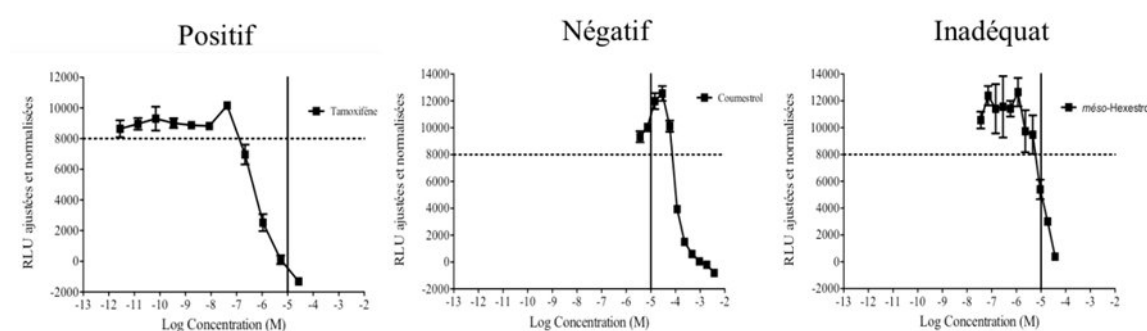
40. Les résultats positifs sont caractérisés à la fois par l'amplitude de l'effet induit et par la concentration correspondant à cet effet, dans la mesure du possible. Des exemples de résultats positifs, négatifs et inadéquats sont présentés dans les graphiques 5 et 6.

Graphique 5: Exemples de résultats positifs, négatifs et inadéquats pour l'effet agoniste



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 $1,00 \times 10^{-5}$ 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 $1,00 \times 10^{-5}$ 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 $1,00 \times 10^{-5}$ 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 épreuve fournisse des données exactes. Dupliquer les résultats de la première épreuve constitue la meilleure garantie que les données obtenues sont correctes (voir le paragraphe 19 de la section «**ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER**»).

RAPPORT D'ESSAI

42. Voir le paragraphe 20 de la section«**ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER**».

BIBLIOGRAPHIE

- (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., 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): 936-5941.
- (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., 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., Inglese J., 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.

APPENDICE 4

ESSAI DE TRANSACTIVATION FAISANT INTERVENIR LE RECEPTEUR DES ŒSTROGENES ALPHA HUMAIN TRANSFECTE DE FAÇON STABLE POUR LA DETECTION DE L'ACTIVITE ŒSTROGENIQUE AGONISTE ET ANTAGONISTE DES PRODUITS CHIMIQUES A L'AIDE DE LA LIGNEE CELLULAIRE ERα CALUX

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES (VOIR AUSSI L'INTRODUCTION GÉNÉRALE)

1. L'essai de transactivation faisant intervenir la lignée cellulaire ERα 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 (hERα). L'étude de validation de l'essai faisant intervenir la lignée cellulaire ERα 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 ERα CALUX exprime uniquement le récepteur des œstrogènes ERα humain transfecté de façon stable (2) (3).
2. Cet essai est conçu spécifiquement pour détecter la transactivation médiée par hERα 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 µM 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 appendice 2).
4. Il convient de consulter les sections « INTRODUCTION GENERALE» et «ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE LA TA ER» avant de mettre en œuvre le présent essai à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont indiquées à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI (Voir aussi l'INTRODUCTION GÉNÉRALE)

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 CE₅₀ ou de la CI₅₀ 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 α 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 CO₂ (5 % de CO₂) à 37°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 1x10⁵cellules/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 µl de suspension cellulaire homogénéisée). Les cellules sont ensuite

pré-incubées dans un incubateur de CO₂ (5 % de CO₂, 37°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 CE₅₀ (activité agoniste) ou CI₅₀ (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 CE₅₀ ou CI₅₀ 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	$1,0 \times 10^{-13}$ – $1,0 \times 10^{-10}$
Témoin positif (TP)	17α -méthyltestostérone	58-18-4	$3,0 \times 10^{-06}$
Témoin négatif (TN)	corticostérone	50-22-6	$1,0 \times 10^{-08}$

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	$3,0 \times 10^{-09}$ – $1,0 \times 10^{-05}$
Témoin positif (TP)	4-hydroxytamoxifène	68047-06-3	$1,0 \times 10^{-09}$
Témoin négatif (TN)	resvératrol	501-36-0	$1,0 \times 10^{-05}$

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 to 2,0
5	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 to 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 (17β-estradiol)
8	Gamme de CE ₅₀ de l’étalon de référence 17β-œstradiol	4*10 ⁻¹² – 4*10 ⁻¹¹ M
9	Facteur multiplicatif minimum de l’augmentation de l’induction de la plus forte concentration de 17β-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 ERα CALUX de détection de l’activité antagoniste

A - individual samples on a plate		Criterium
1	% maximum des ET des puits tripliqués (pour TN, TP, chaque dilution du produit chimique d’essai, l’étalon de référence, témoin contenant le	< 15%

	solvant (C0))	
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 to 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 to 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 to 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 ($1,0 \times 10^{-13}$, $3,0 \times 10^{-13}$, $1,0 \times 10^{-12}$, $3,0 \times 10^{-12}$, $6,0 \times 10^{-12}$, $1,0 \times 10^{-11}$, $3,0 \times 10^{-11}$, $1,0 \times 10^{-10}$ 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 ($3,0 \times 10^{-9}$, $1,0 \times 10^{-8}$, $3,0 \times 10^{-8}$, $1,0 \times 10^{-7}$, $3,0 \times 10^{-7}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $3,0 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-5}$ M). Chacune des concentrations de l'étalon de référence antagoniste est

co-incubée avec une concentration fixe de l'étalon de référence agoniste 17β -œstradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Témoin positif

28. Le témoin positif pour les études d'activité agoniste est la 17α -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 17β -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 17β -œstradiol ($3,0 \cdot 10^{-12}$ M).

Démonstration de la compétence du laboratoire (voir paragraphe 14 et tableaux 3 et 4 de la rubrique «ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER» de la présente méthode d'essai).

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 l'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 4.1) 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 μ l de cellules remises en suspension sont placées dans les puits intérieurs d'une plaque microtitre 96 puits. Les puits extérieurs sont remplis avec 200 μ l de tampon phosphate salin (PBS) (voir figures 1 et 2). Les cellules des puits intérieurs sont ensuite pré-incubées dans un incubateur à CO₂ (5 % de CO₂, 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 4.1), 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 μ l 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 17 β -œstradiol ($3,0 \times 10^{-12}$ 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 CO₂ (5 % de CO₂, 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.
- TP = témoin positif.
- 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.
- 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

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	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 = reference standard solvent.
- C(1-8) = series of dilutions (1-8, low-to-high concentrations) of reference standard.
- NC = Négative control.
- PC = Positive control.
- TCx-(1-8) = dilutions (1-8, low-to-high concentrations) of test chemical for the prescreen run and assessment of agonistic effect of test chemical x.
- TS = témoin contenant le solvant du produit chimique d'essai (de préférence le même solvant que C0, mais provenant éventuellement d'un autre lot)..

TV = témoin contenant le véhicule (témoin contenant le solvant mais ne contenant pas de concentration fixe de l'étalon de référence agoniste - 17 β -œstradiol)..

Cellules grisées: = puits externes, remplis de 200 μ l 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 17 β -œstradiol (3,0*10⁻¹² M)/.

Mesure de la luminescence

39. La mesure de luminescence est décrite en détail dans le protocole de l'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 l'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 triplicés 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-oestradiol		Dilution du TCx durant l'épreuve de présélection		Dilution du TCx durant l'épreuve complète		Conc. (M) des témoins	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	TP	3,0*10 ⁻⁰⁶
C1	1,0*10 ⁻¹³	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	TN	1,0*10 ⁻⁰⁸

C2	$3,0 \cdot 10^{-13}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$1,0 \cdot 10^{-12}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	TS	0
C4	$3,0 \cdot 10^{-12}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$6,0 \cdot 10^{-12}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1,0 \cdot 10^{-11}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3,0 \cdot 10^{-11}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	$1,0 \cdot 10^{-10}$						

TCx - roduit chimique d'essai x

TP - témoin positif (17 α -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	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	TP	$1,0 \cdot 10^{-09}$
C1	$3,0 \cdot 10^{-09}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	TN	$1,0 \cdot 10^{-05}$
C2	$1,0 \cdot 10^{-08}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3,0 \cdot 10^{-08}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1,0 \cdot 10^{-07}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x	Conc. (M) de l'étalon de référence agoniste	
C5	$3,0 \cdot 10^{-07}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	$1,0 \cdot 10^{-06}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	$3,0 \cdot 10^{-06}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17 β -oestradiol	$3,0 \cdot 10^{-12}$
C8	$1,0 \cdot 10^{-05}$						

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 17 β -œstradiol utilisé pour la détection de l'activité agoniste ($3,0 \cdot 10^{-12}$ 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 (TCx_{max}) d'un produit chimique sont déterminées pour les

essais agonistes. Pour les essais antagonistes, les valeurs CI₂₀, CI₅₀, TP₈₀, TP₅₀ et l'induction minimale (TCx_{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

Y = réponse (induction relative (%))

Sommet = induction maximale (%)

Base = induction minimale (%)

LogCE₅₀ = logarithme de la concentration correspondant à la réponse située à mi-chemin entre la base et le sommet

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).

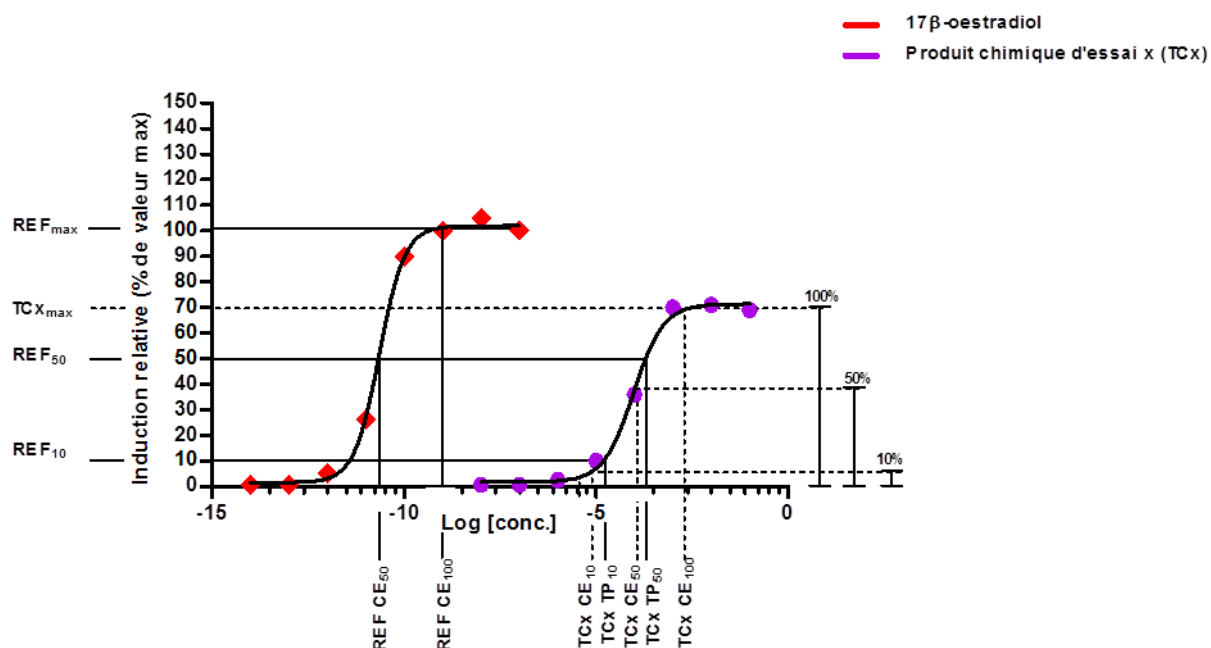
- Déterminer les valeurs CE_{50} et CE_{10} de l'étalon de référence.
- Déterminer les valeurs CE_{50} et CE_{10} des produits chimiques d'essai.
- Déterminer l'induction relative maximale du produit chimique d'essai (TC_{max}).
- Déterminer les valeurs TP_{10} et TP_{50} des produits chimiques d'essai.

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

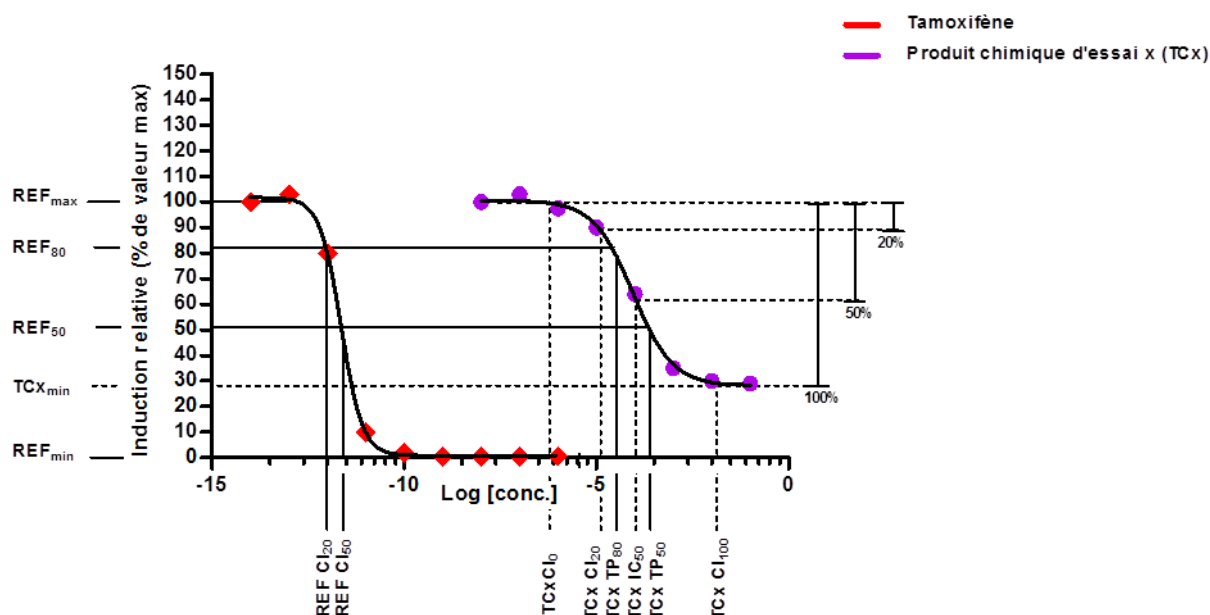
- Soustraire les URL moyennes de la concentration maximale d'étalon de référence des données brutes relatives aux étalons de référence.
- Soustraire les URL moyennes de la concentration maximale d'étalon de référence des données brutes relatives aux produits chimiques d'essai.
- Calculer l'induction 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



- CE₁₀ = concentration de substance à laquelle 10 % de la réponse maximale est observée.
 CE₅₀ = concentration de substance à laquelle 50 % de la réponse maximale est observée.
 TP₁₀ = concentration de produit chimique d'essai équivalant à la CE₁₀ de l'étalon de référence.
 TP₅₀ = concentration de produit chimique d'essai équivalant à la CE₅₀ 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.

TCx_{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) épreuves indépendantes. Si deux épreuves donnent des résultats comparables et donc reproductibles, il n'est pas nécessaire de réaliser une troisième épreuve. 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

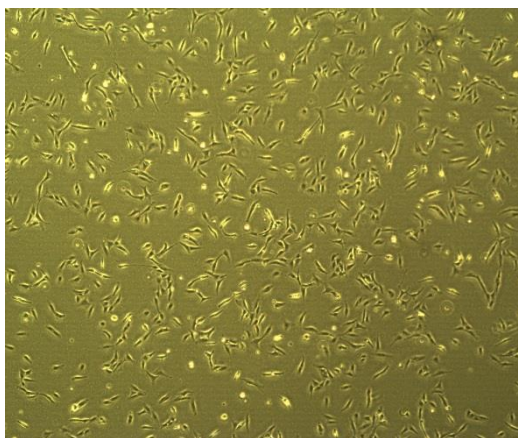
61. Voir le paragraphe 20 de la section «ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE TA ER»

BIBLIOGRAPHIE

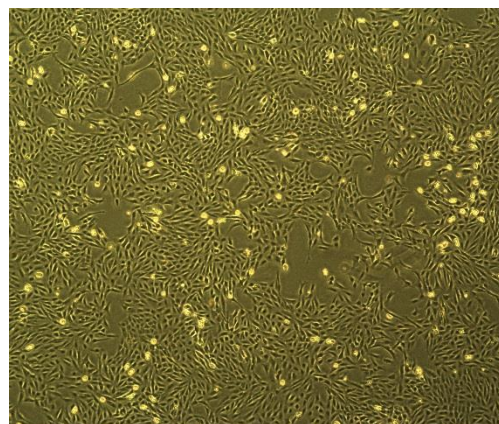
- (1) OCDE (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER α CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation de coopération et de développement économiques, 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, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) α and not through ER β . *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.
- (4) Thorne N, Inglese J and 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, Cavaillès V and 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 and 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, and 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 and Ishii H. (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.
- (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, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER α CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, the Netherlands.

Appendice 4.1: Inspection visuelle de la viabilité des cellules

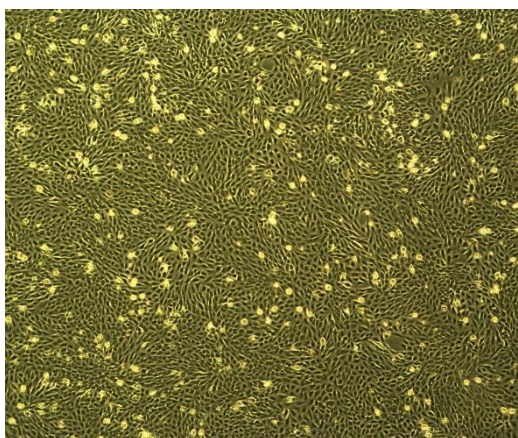


Confluence <5 %. Les cellules viennent d'être ensemencées. Viabilité cellulaire de 100 %.
Classification: «absence de cytotoxicité»



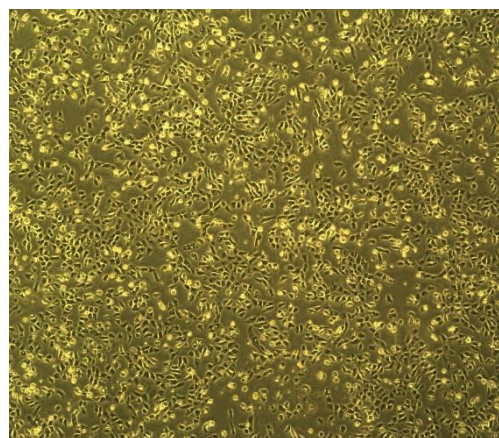
Confluence > 85 %. À ce stade, les cellules sont exposées aux produits chimiques. Viabilité cellulaire > 95 %.

Classification: «absence de cytotoxicité»

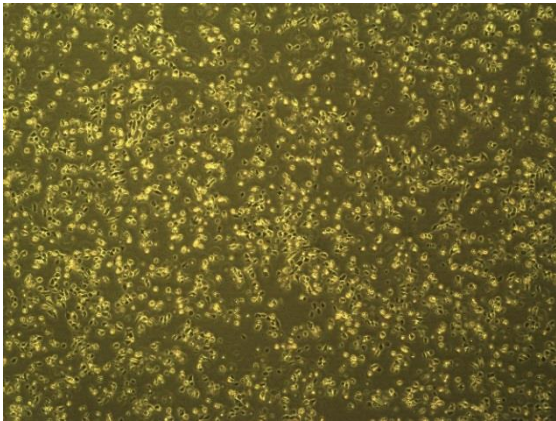


Confluence > 95 %. Les cellules sont densément organisées et commencent à proliférer. Viabilité cellulaire > 95 %.

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»”

B.67 ESSAIS *IN VITRO* DE MUTATION GENIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFERES UTILISANT LE GENE DE LA THYMIDINE KINASE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 490 (2016) de l'OCDE, pour les essais de produits chimiques. Les méthodes d'essai sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et des considérations relatives au bien-être des animaux. Initialement, l'essai sur cellules de lymphome de souris (ou essai MLA, pour *Mouse Lymphoma Assay*) et l'essai sur TK6 utilisant des loci de la thymidine kinase (TK) figuraient dans la méthode d'essai B.17. Par la suite, le groupe d'experts sur les cellules de lymphome de souris de l'atelier international sur les essais de génotoxicité (IWGT) a élaboré des recommandations internationales harmonisées pour les critères d'acceptation des essais et l'interprétation des données de l'essai MLA (1) (2) (3) (4) (5), et ces recommandations sont incorporées dans la présente nouvelle méthode d'essai B.67. Cette méthode d'essai est rédigée pour l'essai MLA ainsi que pour l'essai sur TK6, car ce dernier utilise également le locus TK. Cependant, alors que l'essai MLA est largement utilisé à des fins réglementaires, l'essai sur TK6 est utilisé bien moins fréquemment. Il est à noter que malgré la similitude de leurs critères d'évaluation, les deux lignées cellulaires ne sont pas interchangeables et des programmes réglementaires peuvent valider une préférence pour l'un par rapport à l'autre dans le cadre d'un usage réglementaire particulier. Par exemple, la validation du MLA a démontré sa pertinence pour la détection des dommages sur la structure des chromosomes causés par le produit chimique d'essai, en plus de la capacité de l'essai pour identifier les mutations géniques. Elle s'inscrit dans une série de méthodes d'essai sur la toxicologie génétique. L'OCDE a élaboré un document contenant des éléments d'information concis sur les essais de toxicologie génétique ainsi qu'un aperçu des récents changements qui ont été apportés aux lignes directrices de l'OCDE concernant la toxicité génétique (6).
2. Les essais *in vitro* de mutation génique sur cellules de mammifères ont pour objectif de détecter des mutations induites par des produits chimiques. Les lignées cellulaires utilisées dans ces essais mesurent les mutations directes dans les gènes rapporteurs, en particulier le gène endogène de la thymidine kinase (*TK* pour les cellules humaines et *Tk* pour les cellules de rongeurs, collectivement dénommés *TK* dans la présente méthode d'essai). Deux lignées cellulaires sont concernées par la présente méthode d'essai: la lignée de cellules de lymphome de souris L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C (généralement dénommée L5178Y) et la lignée de cellules humaines lymphoblastoïdes TK6 (généralement dénommée TK6). Bien que ces deux lignées cellulaires varient en raison de leur origine, croissance cellulaire, statut p53, etc., les

essais de mutation génique de la *TK* peuvent être menés de manière similaire dans les deux types de cellules décrits dans la présente méthode d'essai.

3. La nature autosomique et hétérozygote du gène de la thymidine kinase permet de détecter les colonies viables dont les cellules sont déficientes en enzyme thymidine kinase suite à la mutation de $TK^{+/-}$ en $TK^{-/-}$. Ce déficit peut résulter d'événements génétiques affectant le gène de la *TK*, notamment des mutations du gène (mutations ponctuelles, mutations décalant le cadre de lecture, petites délétions, etc.) et des événements chromosomiques (délétions importantes, réarrangements chromosomiques et recombinaison mitotique). Ces derniers événements sont exprimés par la perte d'hétérozygotie, qui est une modification génique courante des gènes suppresseurs lors de la tumorigenèse chez l'homme. En théorie, la perte de la totalité du chromosome portant le gène de la *TK* résultant de l'altération du fuseau et/ou de la non-disjonction mitotique peut être détectée dans l'essai MLA. En effet, l'analyse cytogénétique et moléculaire combinée montre clairement que certains mutants de la *TK* dans l'essai MLA sont le résultat d'une non-disjonction. Cependant, les données scientifiques démontrent que les tests de mutation génique de la *TK* ne peuvent pas détecter de manière fiable les substances aneugènes lors de l'application des critères de cytotoxicité standard (tels que décrits dans la présente méthode d'essai) et que par conséquent, il ne convient pas d'utiliser ces tests pour détecter ces dernières (7) (8) (9).
4. Deux classes phénotypiques distinctes de mutants de la *TK* sont générées lors des essais de mutation génique de la *TK*; les mutants dont la croissance est normale qui grandissent à la même vitesse que les cellules *TK* hétérozygotes, et les mutants à la croissance faible qui grandissent avec des temps de doublement plus longs. Les mutants à la croissance normale et à la croissance faible sont reconnus sous forme de grande colonie ou de petite colonie de mutants dans l'essai MLA, et en tant que colonie de mutants apparaissant précocement ou tardivement dans l'essai sur TK6. La nature moléculaire et cytogénétique des deux sortes de colonies de mutants dans l'essai MLA (petites et grandes) a été étudiée en détail (8) (10) (11) (12) (13). La nature moléculaire et cytogénétique des mutants TK6 apparaissant précocement et tardivement a aussi été largement étudiée (14) (15) (16) (18). Les mutants à la croissance lente pour les deux types de cellules ont subi des lésions génétiques impliquant le ou les gènes régulateurs présumés de la croissance situés près du locus *TK*, ce qui entraîne des temps de doublement plus longs et la formation de petites colonies ou de colonies apparaissant tardivement (18). L'induction de mutants à croissance lente a été associée à des produits chimiques qui induisent des changements structurels bruts au niveau chromosomique. Les cellules dont les lésions

n'impliquent pas de gènes régulateurs présumés de la croissance près du locus TK grandissent à des vitesses similaires à celles des cellules parentales et deviennent des mutants à la croissance normale. L'induction de mutants à la croissance essentiellement normale est associée à des produits chimiques agissant principalement comme mutagènes ponctuels. En conséquence, il est essentiel de comptabiliser à la fois les mutants à croissance lente et les mutants à croissance normale afin de détecter tous les mutants et de fournir des informations sur le ou les types de lésions (mutagènes par rapport à clastogènes) induits par le produit chimique d'essai (10) (12) (18) (19).

5. La méthode d'essai est organisée de manière à fournir des informations générales qui s'appliquent aux essais sur cellules de lymphome de souris (MLA) et sur TK6, ainsi que des indications particulières pour les essais individuels.
6. Les définitions des termes employés sont présentées à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

7. Les essais conduits *in vitro* requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique, mais celle-ci est incapable de reproduire parfaitement les conditions *in vivo*.
8. On prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de conduire à de faux résultats positifs (à savoir une possible interaction avec le système d'essai) non causés par une interaction entre le produit chimique d'essai et le matériel génétique de la cellule;; ces conditions peuvent être une modification du pH ou de l'osmolalité, une interaction avec les composants du milieu (20) (21), ou une cytotoxicité excessive (22) (23) (24). Une cytotoxicité supérieure aux plafonds recommandés tels que définis au paragraphe 28 est considérée comme excessive pour les essais MLA et sur TK6. En outre, il convient de noter que les produits chimiques d'essai qui sont des analogues de la thymidine, ou qui se comportent comme des analogues de la thymidine, peuvent augmenter la fréquence des mutants par croissance sélective des mutants spontanés de fond lors du traitement cellulaire, et que leur évaluation nécessite le recours à des méthodes d'essai additionnelles (25).
9. Pour les nanomatériaux manufacturés, il peut s'avérer nécessaire d'apporter certaines adaptations spécifiques à cette méthode d'essai, mais ces adaptations ne sont pas décrites ici.
10. Avant d'appliquer la présente méthode d'essai à un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si, et dans l'affirmative pourquoi, elle

peut fournir des résultats acceptables dans ce cadre réglementaire. Cette vérification n'est pas nécessaire si l'essai du mélange répond à des exigences réglementaires.

11. Des cellules déficientes en thymidine kinase (TK), en raison de la mutation directe TK^{+/-} en TK^{-/-}, sont résistantes aux effets cytostatiques de la trifluorothymidine (TFT), un analogue de la pyrimidine. Les cellules riches en TK sont sensibles à la TFT, qui entraîne une inhibition du métabolisme et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, des cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TFT et former des colonies visibles, tandis que les cellules normales qui contiennent l'enzyme TK ne le peuvent pas.

PRINCIPE DE L'ESSAI

12. Des cellules en suspension sont exposées au produit chimique d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique (voir paragraphe 19), pendant une période de temps appropriée (voir paragraphe 32), puis sont repiquées afin de déterminer la cytotoxicité et de laisser le phénotype s'exprimer avant la sélection des mutants. On détermine la cytotoxicité en mesurant la croissance relative totale des cultures (CRT, voir paragraphe 25) pour l'essai MLA et la survie relative (SR, voir paragraphe 26) pour l'essai sur TK6. Les cultures traitées sont maintenues dans un milieu de croissance pendant une période de temps suffisante, caractéristique de chaque type de cellule (voir paragraphe 37), afin de permettre une expression phénotypique quasi-optimale des mutations induites. Une fois l'expression phénotypique obtenue, on détermine la fréquence des mutants en ensemençant avec un nombre connu de colonies un milieu contenant l'agent sélectif permettant de détecter les colonies mutantes. Dans un milieu exempt d'agent sélectif, on détermine l'efficacité de clonage (viabilité). Après un temps d'incubation approprié, les colonies sont comptées. La fréquence des mutants est calculée en fonction du nombre de colonies mutantes corrigé par l'efficacité de clonage au moment de la sélection des mutants.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Cellules

13. Pour l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA): L'essai MLA ayant été développé et caractérisé en utilisant la sous-lignée TK^{+/-}-3.7.2C de cellules L5178Y, c'est cette sous-lignée spécifique qui doit être utilisée pour cet essai. La lignée cellulaire L5178Y est dérivée d'un lymphome thymique induit par

méthylcholanthrène provenant d'une souris DBA-2 (26). Clive et ses collègues ont traité des cellules L5178Y (désignées par Clive sous le nom de TK^{+/+}-3) avec du méthanesulfonate d'éthyle et isolé un clone de TK^{-/-} (désigné sous le nom de TK^{-/-}-3.7) en utilisant de la bromodéoxyuridine comme agent sélectif. Un clone spontané TK^{+/+} (désigné sous le nom de TK^{+/+}-3.7.2.) et un sous-clone (désigné sous le nom de TK^{+/+}-3.7.2C) ont été isolés à partir du clone TK^{-/-} et caractérisés pour être utilisés dans l'essai MLA (27). Le caryotype de la lignée cellulaire a fait l'objet d'une publication (28) (29) (30) (31). Le nombre modal de chromosomes est 40. Un chromosome métacentrique (t12;; 13) doit être compté comme un chromosome. Le locus *TK* de la souris est situé sur l'extrémité distale du chromosome 11. La lignée de cellules L5178Y TK^{+/+}-3.7.2C comporte des mutations sur les deux allèles du gène p53 et produit une protéine p53 mutée (32) (33). C'est probablement grâce au statut du gène p53 de la lignée cellulaire TK^{+/+}-3.7.2C que l'essai est capable de détecter des lésions à grande échelle (17).

14. Pour l'essai sur TK6: La lignée TK6 est une lignée de cellules humaines lymphoblastoïdes. La lignée cellulaire parentale est une lignée cellulaire transformée par le virus d'Epstein-Barr, WI-L2, initialement dérivée d'un sujet de sexe masculin âgé de 5 ans atteint de sphérocytose héréditaire. Le premier clone isolé, HH4, a été mutagénisé avec de l'ICR191 et une lignée de cellules *TK* hétérozygotes, baptisées K6, a été ainsi générée (34). Les cellules TK6 sont presque toutes diploïdes et le caryotype représentatif est 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Le locus *TK* chez l'homme est situé sur le bras long du chromosome 17. La lignée TK6 est une lignée de cellules compétentes en p53, car elle comporte une séquence p53 de type sauvage dans les deux allèles et exprime seulement la protéine p53 de type sauvage (36).
15. Lors de l'établissement initial de la culture mère ou de sa reconstitution pour les essais MLA et sur TK6, il est recommandé que le laboratoire d'essai veille à l'absence de contamination par *mycoplasmes*, procède au caryotypage des cellules ou peigne les chromosomes hébergeant le locus *TK*, et vérifie les temps de doublement de la population. La durée normale du cycle cellulaire des cellules utilisées dans le laboratoire d'essai doit être établie et doit correspondre aux caractéristiques cellulaires publiées (16) (19) (37). Cette culture mère doit être conservée à -150 °C ou à une température inférieure et utilisée pour préparer les cultures cellulaires de travail.
16. Avant de produire un grand nombre de cultures de travail cryoconservées ou juste avant d'être utilisée pour une expérience, il pourra s'avérer nécessaire de débarrasser la culture des cellules mutantes qu'elles contiennent [sauf si la fréquence des mutants (FM) dans le témoin avec solvant figure déjà dans la plage de valeurs acceptables — voir le tableau 2 pour l'essai MLA]. On utilise pour cela le méthotrexate

([aminoptérine](#)) afin d'écarter les cellules déficientes en TK et on ajoute de la thymidine, de l'hypoxanthine et de la glycine (L5178Y) ou de la 2'-déoxycytidine (TK6) à la culture afin de garantir une croissance optimale des cellules compétentes en TK (19) (38) (39) (40). Des conseils d'ordre général sur les bonnes pratiques concernant l'entretien des cultures cellulaires ainsi que des conseils spécifiques pour les cellules L5178Y et TK6 sont disponibles dans la littérature (19) (31) (37) (39) (41). Pour les laboratoires ayant besoin de cultures cellulaires mères pour lancer un essai sur cellules de lymphome de souris ou TK6 ou pour obtenir de nouvelles cultures cellulaires mères, une banque de cellules bien caractérisées est disponible (37).

Milieu et conditions de culture

17. Pour les deux essais, il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (par exemple, récipients de culture, atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂, température d'incubation de 37 °C) appropriés pour la conservation des cultures. Les cultures cellulaires doivent toujours être maintenues dans des conditions qui garantissent leur croissance en phase exponentielle. Il est particulièrement important de choisir des milieux et des conditions de culture qui stimulent la croissance optimale des cellules pendant la période d'expression et le clonage de cellules, tant mutantes que non mutantes. Pour les essais MLA et sur TK6, il importe également que les conditions de culture garantissent une croissance optimale tant pour les mutants *TK* en grandes colonies/apparaissant précocement que ceux en petites colonies/apparaissant tardivement. De plus amples détails sur les cultures, notamment le besoin de chauffer de manière adéquate le sérum de cheval pour l'inactiver si un milieu RPMI est utilisé lors de la sélection des mutants, sont disponibles dans la littérature (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Préparation des cultures

18. Les cellules sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans un milieu de culture à une densité telle que les cultures en suspension poursuivront leur croissance de manière exponentielle tout au long du traitement et des périodes d'expression.

Activation métabolique

19. Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules L5178Y et TK6 dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé, recommandé par défaut, sauf justification contraire, est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foies de rongeurs (généralement des rats) traités avec des inducteurs enzymatiques comme l'Aroclor 1254 (43) (44) (45) ou une association de

phénobarbital et de β -naphthoflavone (46) (47) (48) (49) (50) (51). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (52) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Arcolor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (45) (46) (47) (48) (49). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 2 % mais qui peut être portée à 10 % (v/v) dans le milieu d'essai final. Le choix du type et de la concentration du système d'activation métabolique exogène ou de l'inducteur métabolique utilisé pourra dépendre de la classe des produits chimiques à tester.

Préparation du produit chimique d'essai

20. Les produits chimiques solides à tester sont dissous dans un solvant approprié puis, le cas échéant, dilués avant application (voir paragraphe 21). Avant le traitement, les produits chimiques liquides peuvent être ajoutés directement et/ou après dilution au système d'essai. Les produits gazeux ou volatils nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients de culture hermétiquement clos (53) (54) (55). Il convient de préparer les produits chimiques d'essai juste avant le traitement, à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'ils peuvent être stockés.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Solvants

21. Le solvant doit être choisi de manière à optimiser la solubilité des produits chimiques d'essai, sans engendrer d'effets néfastes sur la conduite de l'essai, c'est-à-dire sans modifier la croissance cellulaire, nuire à l'intégrité du produit chimique d'essai, réagir avec les récipients de culture ou détériorer le système d'activation métabolique. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant (ou milieu de culture) aqueux chaque fois que cela est possible. L'eau et le diméthylsulfoxyde sont des exemples de solvants couramment utilisés. En règle générale, les solvants organiques ne doivent pas dépasser 1 % (v/v) et les solvants aqueux (salin ou eau) 10 % (v/v) dans le milieu de traitement final. L'emploi d'un solvant inhabituel (éthanol ou acétone, par exemple) doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité avec le produit chimique d'essai et le système d'essai, ainsi que de son absence de génotoxicité aux concentrations utilisées. En l'absence de telles données, il est important d'inclure dans l'essai des témoins non traités (voir les définitions à l'appendice 1) afin de démontrer que le solvant choisi n'entraîne aucun effet délétère ou mutagène.

MESURE DE LA CYTOTOXICITE CELLULAIRE ET CHOIX DES CONCENTRATIONS DU TRAITEMENT

22. Lors de la détermination de la plus forte concentration du produit chimique d'essai à tester, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 28), une précipitation (voir paragraphe 29) dans le milieu de culture, ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (voir paragraphe 8). Si le produit chimique d'essai provoque une modification marquée du pH du milieu au moment de son ajout, il est possible d'ajuster le pH par tamponnage du milieu de traitement final de manière à éviter les faux résultats positifs et à maintenir des conditions de culture appropriées.
23. La concentration est sélectionnée en fonction de la cytotoxicité et d'autres considérations (voir paragraphes 27 à 30). Un essai préliminaire visant à évaluer la cytotoxicité peut s'avérer utile pour mieux cerner les concentrations à utiliser dans l'essai principal, mais il n'est pas obligatoire. Même si une évaluation initiale de la cytotoxicité a été effectuée, il reste indispensable de mesurer la cytotoxicité pour chaque culture dans le cadre de l'expérience principale. Si une expérience est menée pour déterminer les concentrations à utiliser, elle doit couvrir une large gamme de concentrations et doit soit être achevée au Jour 1 après le traitement, soit être menée jusqu'à l'expression du Jour 2 et la sélection des mutants (s'il apparaît que les concentrations utilisées sont appropriées).
24. La cytotoxicité doit être déterminée pour chaque culture d'essai individuelle et chaque culture témoin: les méthodes à employer pour l'essai MLA (2) et l'essai sur TK6 (15) sont définies par la pratique internationalement reconnue.
25. Pour les deux versions de l'essai MLA, avec gélose et avec micropuits, la cytotoxicité est évaluée en utilisant la croissance relative totale (CRT), initialement définie par Clive et Spector en 1975 (2). Cette mesure comprend la croissance relative en suspension (CRS: culture d'essai par rapport au témoin avec solvant) durant le traitement cellulaire, le délai d'expression et l'efficacité de clonage relative (ECR: culture d'essai par rapport au témoin avec solvant) lorsque les mutants sont sélectionnés (2) Il convient de noter que la CRS inclut toute perte cellulaire se produisant dans la culture d'essai durant le traitement (voir les formules à l'appendice 2).
26. Pour l'essai sur TK6, la cytotoxicité est évaluée au regard de la survie relative (SR), à savoir l'efficacité de clonage des cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement, ajustée en fonction d'éventuelles pertes cellulaires en cours de traitement,

en fonction du nombre de cellules comparativement au témoin négatif (à qui l'on a attribué une survie de 100 %) (voir les formules à l'appendice 2).

27. Il convient d'évaluer au moins quatre concentrations d'essai (sans compter les témoins avec solvant et les témoins positifs) remplissant les critères d'acceptabilité (cytotoxicité appropriée, nombre de cellules, etc.). Alors que l'utilisation de cultures en double exemplaire est recommandée, chacune des cultures réalisées en un seul ou plusieurs exemplaires peut être utilisée à chaque concentration d'essai. Les résultats obtenus pour chacune des répliques à une concentration donnée doivent faire l'objet de rapports distincts mais peuvent être regroupés pour l'analyse des données (55). Pour les produits chimiques dont la cytotoxicité est faible ou nulle, des niveaux de concentrations espacés d'un facteur de 2 à 3 environ conviendront généralement. En cas de cytotoxicité, les concentrations d'essai retenues doivent couvrir une plage englobant la concentration produisant une cytotoxicité telle que décrite au paragraphe 28 et les concentrations pour lesquelles une cytotoxicité modérée, faible ou nulle est observée. De nombreux produits chimiques d'essai présentent des courbes concentration-réponse à forte pente et, afin de couvrir toute la plage de valeurs de la cytotoxicité ou pour étudier en détail la réponse à la concentration, il pourra s'avérer nécessaire d'utiliser des concentrations plus rapprochées et plus de quatre concentrations, notamment dans les cas où il est nécessaire de répéter l'expérience (voir paragraphe 70). Si l'on réalise des cultures en un seul exemplaire, il peut être particulièrement important d'utiliser plus de 4 concentrations.
28. Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une CRT comprise entre 20 et 10 % pour l'essai MLA, et une SR comprise entre 20 et 10 % pour l'essai sur TK6 (paragraphe 67).
29. Pour les produits chimiques d'essai peu solubles qui ne sont pas cytotoxiques à des concentrations inférieures à la concentration insoluble la plus faible, la plus forte concentration analysée doit produire une turbidité ou un précipité visible à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope inversé à la fin du traitement avec le produit chimique d'essai. Même si une cytotoxicité intervient au-delà de la concentration insoluble la plus faible, il est recommandé de tester une seule concentration produisant une turbidité ou un précipité visible, car de fausses réponses pourraient découler de ce précipité. Les essais MLA et sur TK6 utilisant des cultures en suspension, il convient de s'assurer particulièrement que ce dernier n'interfère pas avec la conduite de l'essai. Il peut être utile de déterminer la solubilité dans le milieu de culture préalablement à l'essai.

30. Si aucun précipité ou aucune cytotoxicité limitante ne sont observés, la concentration d'essai maximale doit correspondre à la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/ml ou 2 µl/ml (57) (58). Lorsque la composition du produit chimique d'essai n'est pas définie, par exemple dans le cas de substances de composition inconnue ou variable, de produits de réaction complexes ou de matériels biologiques [c'est-à-dire, substances chimiques de composition inconnue ou variable (UVCB)], de produits extraits de l'environnement etc., il peut être nécessaire d'augmenter la concentration maximale (5 mg/ml par exemple), en l'absence de cytotoxicité suffisante, afin d'accroître la concentration de chacun des composants. Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (59).

Témoins

31. Des témoins négatifs concomitants (voir paragraphe 21), constitués uniquement du solvant dans le milieu de traitement et testés de la même façon que les cultures traitées, doivent être inclus pour chaque condition expérimentale.
32. Des témoins positifs concomitants sont nécessaires pour démontrer la capacité du laboratoire d'identifier les mutagènes dans les conditions du protocole d'essai utilisé, ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique exogène (le cas échéant), et pour démontrer la détection adéquate de mutants *TK* en petites colonies/apparaissant tardivement et en grandes colonies/apparaissant précocement. Le tableau 1 ci-dessous présente des exemples de témoins positifs. D'autres substances chimiques peuvent être utilisées comme témoins positifs, si cela est justifié. Étant donné que les essais *in vitro* de génotoxicité sur cellules de mammifères sont suffisamment normalisés en ce qui concerne les traitements parallèles de courte durée (de 3 à 4 heures) effectués avec et sans activation métabolique pendant la même durée de traitement, l'utilisation de témoins positifs peut être limitée à un mutagène nécessitant une activation métabolique. Dans ce cas, cette seule réponse dans un témoin positif démontrera à la fois l'activité du système d'activation métabolique et la réactivité du système d'essai. En cas de traitement de longue durée (c'est-à-dire, 24 heures sans S9), celui-ci doit toutefois disposer de son propre témoin positif, étant donné que la durée du traitement sera différente de celle de l'essai ayant recours à une activation métabolique. Chaque témoin positif doit être utilisé à une ou plusieurs concentrations devant normalement donner lieu à une augmentation reproductible et détectable par rapport à la valeur de fond afin de démontrer la sensibilité du système d'essai, et la réponse ne doit pas être compromise par une cytotoxicité supérieure aux limites fixées dans la présente méthode d'essai (voir paragraphe 28).

Tableau 1: Substances de référence recommandées pour la vérification des compétences du laboratoire et pour la sélection des témoins positifs

Catégorie	Substance	N° CAS
1. Mutagènes actifs sans activation métabolique		
Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3	
Mitomycine C	50-07-7	
N-oxyde de nitro-4 quinoline	56-57-5	
2. Mutagènes nécessitant une activation métabolique		
Benzo(a)pyrène	50-32-8	
Cyclophosphamide (monohydraté)	50-18-0 (6055-19-2)	
Diméthyl-7,12 benzanthrène	57-97-6	
3-Méthylcholanthrène	56-49-5	

MODE OPÉRATOIRE

Traitement avec le produit chimique d'essai

33. Les cellules en prolifération sont traitées avec le produit chimique d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique. La durée d'exposition doit être suffisante (de 3 à 4 heures sont généralement efficaces). Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (59). Pour l'essai MLA, dans les cas où le traitement à court terme donne des résultats négatifs, et si les informations présentes suggèrent la nécessité d'un traitement plus long [par ex., analogues nucléosidiques, produits chimiques faiblement solubles, (5) (59)], il convient d'envisager un traitement plus long, c'est-à-dire, de 24 heures sans S9.
34. Le nombre minimal de cellules utilisées pour chaque culture (témoin et traitée) d'essai à chaque étape de l'essai doit être basé sur la fréquence de mutants spontanés. Il est conseillé en général de traiter et repiquer suffisamment de cellules dans chaque culture expérimentale pour préserver au moins 10, mais dans l'idéal 100, mutants spontanés à toutes les phases de l'essai (traitement, expression phénotypique et sélection des mutants) (56).
35. Pour l'essai MLA, la fréquence de mutants spontanés acceptable recommandée se situe entre $35 \text{ et } 140 \times 10^{-6}$ (version avec diffusion en gélose) et entre $50 \text{ et } 170 \times 10^{-6}$ (version avec micropuits) (voir le tableau 2). Pour avoir au moins 10, et dans l'idéal

100, mutants spontanés survivant au traitement pour chaque culture d'essai, il est nécessaire de traiter au moins 6×10^6 cellules. Le traitement de ce nombre de cellules, et la préservation de suffisamment de cellules durant l'expression et le clonage pour la sélection des mutants, permet d'obtenir un nombre suffisant de mutants spontanés (10 ou plus) durant toutes les phases de l'expérience, même pour les cultures traitées à des concentrations qui résultent en une cytotoxicité de 90 % (mesurée par une CRT de 10 %) (19) (38) (39).

36. Pour l'essai sur TK6, la fréquence de mutants spontanés se situe généralement entre 2 et 10×10^{-6} . Pour qu'au moins 10 mutants spontanés survivent au traitement pour chaque culture d'essai, il est nécessaire de traiter au moins 20×10^6 cellules. Le traitement de ce nombre de cellules permet d'obtenir un nombre suffisant de mutants spontanés (10 ou plus), même pour les cultures traitées à des concentrations causant une cytotoxicité de 90 % pendant le traitement (SR de 10 %). Il faut en outre qu'un nombre suffisant de cellules soient cultivées durant la période d'expression et étalées sur plaque pour la sélection des mutants (60).

Délai d'expression phénotypique et mesure de la cytotoxicité et de la fréquence des mutants

37. À l'issue de la période de traitement, les cellules sont cultivées pendant une période de temps définie de façon à permettre l'expression phénotypique quasi-optimale de mutants nouvellement induits;; cette période est spécifique à chaque lignée cellulaire. Pour l'essai MLA, la période d'expression phénotypique est de 2 jours. Pour l'essai sur TK6, la période d'expression phénotypique est de 3 à 4 jours. Dans le cas d'un traitement de 24 heures, la période d'expression commence après la fin du traitement
38. Durant la période d'expression phénotypique, les cellules sont dénombrées quotidiennement. Pour l'essai MLA, on utilise les nombres de cellules quotidiens pour calculer la croissance en suspension (CS) quotidienne. Suite à la période d'expression de 2 jours, les cellules sont suspendues dans le milieu avec ou sans agent sélectif afin de déterminer le nombre de mutants (plaques de sélection) et l'efficacité de clonage (plaques de viabilité), respectivement. Pour cet essai, il existe deux méthodes également acceptables pour le clonage de sélection de mutants: le procédé de diffusion en gélose molle et le procédé en milieu liquide dans des plaques de 96 puits (19) (38) (39). Le clonage dans l'essai sur TK6 s'effectue en utilisant des milieux liquides et des plaques à 96 puits (16).
39. La trifluorothymidine (TFT) est le seul agent sélectif recommandé pour les mutants TK (61).

40. Pour l'essai MLA, les plaques de gélose et les plaques micropuits sont comptées après 10 à 12 jours d'incubation. Pour l'essai sur TK6, les colonies contenues dans les plaques micropuits sont évaluées après 10 à 14 jours pour l'identification de mutants apparaissant précocement. Afin de récupérer les mutants TK6 à croissance lente (apparaissant tardivement), il est nécessaire de réalimenter les cellules avec du milieu de croissance et de la TFT après avoir compté les mutants apparaissant précocement, puis d'incuber les plaques pendant 7 à 10 jours supplémentaires (62). Voir aux paragraphes 42 et 44 la discussion concernant le dénombrement des mutants *TK* à croissance lente et à croissance normale.
41. On trouvera à l'appendice 2 les calculs à effectuer pour les deux essais et les deux versions (diffusion en gélose et micropuits) de l'essai MLA. Pour la méthode de diffusion en gélose utilisée dans l'essai MLA, les colonies sont comptées et le nombre de colonies mutantes est ajusté en fonction de l'efficacité de clonage afin de calculer une fréquence des mutants. Pour la version utilisant les micropuits dans l'essai MLA et dans l'essai sur TK6, l'efficacité de clonage pour la sélection et les plaques d'efficacité de clonage est déterminée selon la distribution de Poisson (63). La fréquence des mutants est calculée à partir de ces deux efficacités de clonage.

Caractérisation des colonies de mutants

42. Pour l'essai MLA, si le produit chimique d'essai est positif (voir paragraphes 62 et 63), la caractérisation des colonies en fonction de leur taille ou de leur croissance doit être réalisée sur au moins une des cultures de traitement (généralement exposée à la concentration acceptable donnant la réponse la plus fortement positive) et sur les témoins négatifs et positifs. Si le produit chimique d'essai est négatif (voir paragraphe 64), la caractérisation des colonies mutantes doit être réalisée sur les témoins négatifs et positifs. Pour la méthode des micropuits de l'essai MLA, les mutants en petites colonies sont ceux qui couvrent moins de 25 % du diamètre du puits et les mutants en grandes colonies sont ceux qui couvrent plus de 25 % du diamètre du puits. Pour la méthode de la diffusion en gélose, un compteur de colonies automatique est utilisé pour dénombrer les colonies mutantes et déterminer la taille des colonies. Les méthodes à suivre pour déterminer la taille des colonies sont décrites de manière détaillée dans la littérature (19) (38) (40). Il est nécessaire de caractériser les colonies dans les témoins négatifs et positifs afin de démontrer que les études sont menées de manière appropriée.
43. Le produit chimique d'essai ne peut pas être déterminé comme étant négatif si les mutants en petites et en grandes colonies ne sont pas adéquatement détectés dans les témoins positifs. La caractérisation des colonies peut être utilisée pour fournir des

informations d'ordre général concernant la capacité du produit chimique d'essai de causer des mutations ponctuelles et/ou des événements chromosomiques (paragraphe 4).

44. TK6: Les mutants à la croissance normale et à la croissance lente sont différenciés en fonction de la différence de temps d'incubation (voir paragraphe 40). Pour l'essai sur TK6, les mutants apparaissant précocement, ainsi que ceux apparaissant tardivement, sont évalués pour l'ensemble des cultures, y compris les témoins négatifs et positifs. Il est nécessaire de caractériser les colonies pour les témoins négatifs et positifs afin de démontrer que les études sont menées de manière appropriée. Le produit chimique d'essai ne peut pas être déterminé comme étant négatif si les mutants apparaissant précocement ainsi que ceux apparaissant tardivement ne sont pas adéquatement détectés dans le témoin positif. La caractérisation des colonies peut être utilisée pour fournir des informations d'ordre général concernant la capacité du produit chimique d'essai de causer des mutations ponctuelles et/ou des événements chromosomiques (paragraphe 4).

Compétence du laboratoire

45. Afin d'acquérir une expérience suffisante de l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit avoir réalisé une série d'expériences avec des substances chimiques positives de référence agissant selon des mécanismes variés (au moins une avec activation métabolique et une sans activation métabolique, sélectionnées parmi les substances chimiques énumérées au tableau 1) et avec plusieurs témoins négatifs (y compris des cultures non traitées et divers solvants/véhicules). Ces réponses de témoins positifs et négatifs doivent être cohérentes par rapport à la littérature. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire, qui disposent d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 47 à 50. Pour l'essai MLA, les valeurs obtenues pour les témoins positifs et négatifs doivent être cohérentes avec les recommandations de l'IWGT (voir tableau 2).
46. Une sélection de substances chimiques utilisées comme témoins positifs (voir tableau 1) doit être testée dans le cadre de traitements de courte et de longue durée (si l'on utilise des traitements de longue durée) en l'absence d'activation métabolique, ainsi que dans le cadre d'un traitement de courte durée en présence d'une activation métabolique, l'objectif étant de démontrer que le laboratoire possède la compétence nécessaire pour détecter des produits chimiques mutagènes, de déterminer l'efficacité du système d'activation métabolique et de prouver l'adéquation des conditions de croissance cellulaire durant le traitement, l'expression phénotypique et la sélection

des mutants, ainsi que l'adéquation des procédures d'évaluation. Il conviendra de définir une plage de concentrations des substances chimiques sélectionnées qui permette d'obtenir des augmentations reproductibles et liées à la concentration par rapport aux valeurs de fond, afin de démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai.

Données des témoins historiques

47. Le laboratoire doit établir:

- une plage et une distribution des témoins positifs historiques,
- une plage et une distribution des témoins négatifs (non traités, avec solvant) historiques.

48. Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution (64) (65)

49. La base des données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit à l'origine être constituée à partir d'au moins 10 expériences, sachant qu'il serait préférable qu'elle en compte au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques [cartes C ou cartes X-barre, par exemple (65)] afin de déterminer la variabilité de leurs données de témoins positifs et négatifs et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie (66). D'autres détails et recommandations sur la façon de regrouper et d'utiliser des données historiques sont fournis dans la littérature (64).

50. Les données des témoins négatifs désignent la fréquence des mutants issus de cultures réalisées en un seul exemplaire, ou de préférence de cultures répliquées, comme décrit au paragraphe 27. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire. Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes et qu'il soit prouvé que le système d'essai est «sous contrôle» (voir paragraphe 49) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou d'erreur humaine.

51. Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée en termes de cohérence avec les bases de données des témoins historiques existantes du laboratoire. Toute incohérence majeure doit conduire à l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Présentation des résultats

52. La présentation de données pour les essais sur cellules de lymphome de souris (MLA) et sur TK6 comprendra, pour les cultures traitées et témoins, les données requises pour le calcul de la cytotoxicité (CRT ou SR, respectivement) et les fréquences des mutants, comme décrit ci-dessous.
53. Pour l'essai MLA, les données seront présentées séparément pour chaque culture en ce qui concerne la CRS, la CRT, l'efficacité de clonage au moment de la sélection des mutants et le nombre de colonies de mutants (pour la version utilisant la diffusion en gélose) ou le nombre de puits vides (pour la version utilisant les micropuits). La fréquence des mutants sera exprimée par le nombre de cellules mutantes par million de cellules survivantes. Si la réponse est positive, les fréquences des mutants en petites et grandes colonies (et/ou le pourcentage de la fréquence des mutants totale) seront données pour au moins une concentration du produit chimique d'essai (en général la concentration positive la plus élevée) et les témoins positifs et négatifs. En cas de réponse négative, la fréquence des mutants en petite et en grande colonie doit être donnée pour le témoin négatif et pour le témoin positif.
54. Pour l'essai sur TK6, les données seront présentées séparément pour chaque culture en ce qui concerne la SR, l'efficacité de clonage au moment de la sélection de mutants et le nombre de puits vides pour les mutants apparaissant précocement et ceux apparaissant tardivement. La fréquence des mutants sera exprimée comme le nombre de cellules mutantes divisé par le nombre des cellules survivantes, et inclura la fréquence des mutants totale ainsi que la fréquence des mutants (et/ou le pourcentage de la fréquence des mutants totale) correspondant aux mutants apparaissant précocement ou tardivement.

Critères d'acceptabilité

55. Pour les essais MLA et sur TK6, il convient de veiller à ce que les critères suivants soient remplis avant de déterminer les résultats globaux pour un produit chimique d'essai spécifique:

- Deux conditions expérimentales (traitement de courte durée avec et sans activation métabolique — voir paragraphe 33) ont été testées, à moins que l'une d'entre elles ait abouti à des résultats positifs.
- Un nombre adéquat de cellules et de concentrations sont analysables (paragraphe 27 et 34 à 36).
- Les critères de sélection de la concentration maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 28 à 30.

Critères d'acceptabilité pour les témoins négatifs et positifs

56. L'analyse effectuée par le groupe d'experts sur les cellules de lymphome de souris de l'IWGT portant sur une grande quantité de données provenant de l'essai MLA a donné lieu à un consensus international sur des critères d'acceptabilité spécifiques de l'essai MLA (1) (2) (3) (4) (5). C'est pourquoi la présente méthode d'essai fournit des recommandations spécifiques pour la détermination de l'acceptabilité des témoins positifs et négatifs et pour l'évaluation des résultats d'une substance individuelle dans le cadre d'un essai MLA. La base de données relative à l'essai sur TK6 est beaucoup plus restreinte et n'a pas été évaluée par un groupe de travail.
57. Pour l'essai MLA, chaque expérience doit être évaluée afin de déterminer si le témoin non traité/avec solvant satisfait aux critères d'acceptabilité du groupe de travail MLA de l'IWGT ((4) et le tableau 2 ci-dessous) en ce qui concerne: (1) la fréquence des mutants (FM) (il est à noter que les FM acceptables selon l'IWGT sont différentes pour les versions utilisant la diffusion en gélose et celles utilisant des micropuits), (2) l'efficacité de clonage (EC) au moment de la sélection des mutants et (3) la croissance en suspension (CS) pour le témoin avec solvant (voir les formules à l'appendice 2).

Tableau 2: Critères d'acceptabilité pour l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA)

Paramètre	Méthode gélose molle	Méthode micropuits
Fréquence des mutants	35 à 140 x 10 ⁻⁶	50 à 170 x 10 ⁻⁶
Efficacité de clonage	65 à 120 %	65 à 120 %
Croissance en suspension	8 à 32 fois (3 à 4 heures de traitement) 32 à 180 fois (24 heures de traitement, si effectué)	8 à 32 fois (3 à 4 heures de traitement) 32 à 180 fois (24 heures de traitement, si effectué)

58. Pour l'essai MLA, chaque test doit également être évalué pour déterminer si le ou les témoins positifs satisfont à au moins un des deux critères d'acceptabilité suivants définis par le groupe de travail de l'IWGT:

- Le témoin positif démontre une augmentation absolue de la fréquence des mutants totale, c'est-à-dire, une augmentation supérieure à la fréquence des mutants spontanée de fond [une fréquence des mutants induite (FMI) d'au moins 300×10^{-6}]. Au moins 40 % de la FMI doit correspondre à la fréquence des mutants en petite colonie.
- Le témoin positif présente une augmentation de la fréquence des mutants en petite colonie d'au moins 150×10^{-6} supérieure à celle observée dans le témoin concomitant non traité/avec solvant (une FMI en petite colonie de 150×10^{-6}).

59. Pour l'essai sur TK6, un essai sera acceptable si les données relatives au témoin négatif concomitant sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins négatifs historiques du laboratoire (voir paragraphes 48 à 49). En outre, les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 32) doivent induire des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants.

60. Pour les deux essais, la limite supérieure de cytotoxicité observée dans la culture du témoin positif doit être la même que celle des cultures expérimentales. En d'autres termes, les CRT/SR ne doivent pas être inférieures à 10 %. Il est suffisant d'utiliser une seule concentration (ou une des concentrations des cultures de témoins positifs si plus d'une concentration est utilisée) pour démontrer que les critères d'acceptabilité pour le témoin positif sont respectés. De plus, la fréquence des mutants du témoin positif doit figurer dans la plage acceptable des valeurs établies pour le laboratoire.

Évaluation et interprétation des résultats

61. Pour l'essai MLA, le groupe d'experts sur les cellules de lymphome de souris de l'IWGT a consacré d'importants travaux à la pertinence biologique et aux critères d'une réponse positive par (4). C'est pourquoi la présente méthode d'essai fournit des recommandations spécifiques pour l'interprétation des résultats de l'essai MLA concernant le produit chimique d'essai (voir paragraphes 62 à 64). La base de données relative à l'essai sur TK6 est beaucoup plus restreinte et n'a pas été évaluée par un groupe de travail. C'est pourquoi les recommandations concernant l'interprétation des données pour l'essai sur TK6 sont exprimées en termes plus généraux (voir paragraphes 65 et 66). Des recommandations complémentaires s'appliquent aux deux essais (voir paragraphes 67 à 71).

MLA

62. Il est recommandé d'adopter une approche permettant de définir les réponses positives et négatives afin de veiller à ce que l'augmentation de la fréquence des mutants soit biologiquement pertinente. Au lieu d'une analyse statistique généralement utilisée pour d'autres essais, cette approche s'appuie sur l'utilisation d'une fréquence de mutants induite prédéfinie (c'est-à-dire, une augmentation de la fréquence des mutants supérieure à celle du témoin concomitant), désignée sous le nom de Facteur d'évaluation global (FEG), et basée sur l'analyse de la distribution des données de fréquence des mutants du témoin négatif des laboratoires participants (4). Pour la version de l'essai MLA utilisant la méthode de diffusion en gélose, le FEG est de 90×10^{-6} et pour la version de l'essai MLA utilisant la méthode des micropuits, le FEG est de 126×10^{-6} .
63. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 33), l'augmentation de la fréquence des mutants au-delà de la fréquence de fond concomitante excède le FEG, et si cette augmentation est liée à la concentration (par exemple au moyen d'un test de tendance). Le produit chimique d'essai est alors considéré comme capable d'induire des mutations dans ce système d'essai.
64. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 33), il n'y a pas de réponse liée à la concentration ou, si l'on observe une augmentation de la fréquence des mutants, celle-ci n'est pas supérieure au FEG. Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des mutations dans ce système d'essai.

TK6

65. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 33):
- au moins une concentration d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;
 - un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la concentration (voir paragraphe 33);

- les résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 48).

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des mutations dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (66) (67).

66. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 33):

- aucune concentration d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant;
- un test de tendance approprié montre qu'il n'y a pas d'augmentation liée à la concentration;
- l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple; voir paragraphe 48).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des mutations dans ce système d'essai.

Pour les deux essais MLA et sur TK6::

67. Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une CRT/SR comprise entre 20 et 10 %. De l'avis général, il faut faire preuve de prudence lors de l'interprétation de résultats positifs uniquement trouvés à une CRT/SR comprise entre 20 et 10 %, et un résultat ne doit être considéré comme positif que si l'augmentation de la fréquence des mutants se produit à une CRT/SR inférieure ou égale à 10 % (si évaluée) (2) (59).

68. Dans certaines circonstances, des informations supplémentaires peuvent aider à déterminer si un produit chimique d'essai n'est pas mutagène lorsqu'aucune culture ne présente une valeur de la CRT à une CRT/SR comprise entre 10 et 20 %. Ces circonstances sont les suivantes: (1) Il n'y a pas de signe de mutagénicité (par exemple, aucune relation dose-réponse, aucune fréquence des mutants supérieure à celles observées dans le témoin négatif concomitant ou les valeurs de fond historiques, etc.) dans une série de points de données situés entre 100 % et 20 % de CRT/RS, et présence d'au moins un point de données entre 20 % et 25 % de CRT/RS. (2) Il n'y a pas de signe de mutagénicité (par exemple, aucune relation dose-réponse,

aucune fréquence des mutants supérieure à celles observées dans le témoin négatif concomitant ou les valeurs de fond historiques, etc.) dans une série de points de données situées entre 100 % et 25 % de CRT/RS, et présence d'un point de données négatif légèrement inférieur à 10 % de CRT/RS. Dans ces deux cas, il peut être conclu que le produit chimique d'essai est négatif.

69. Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou négative.
70. Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, tel que décrit ci-dessus, ou en vue d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'expert et/ou des investigations plus poussées. Il peut être utile de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales modifiées [espacement des concentrations de façon à augmenter la probabilité d'atteindre des points de données dans la plage de valeurs de 10 à 20 % de CRT/SR, autres conditions d'activation métabolique (c'est-à-dire, concentration de S9 ou origine de S9) et durée du traitement, par exemple].
71. Dans de rares cas, même après de nouvelles investigations, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure que les résultats sont positifs ou négatifs. La réponse au produit chimique d'essai devra alors être considérée comme équivoque (et donc potentiellement aussi bien positive que négative).

RAPPORT D'ESSAI

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

Produit chimique d'essai::

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation si disponibles;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue;
- solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues;
- mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant:

- apparence physique, hydrosolubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude;

- 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:

- caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

Solvant:

- justification du choix du solvant;
- pourcentage de solvant présent dans le milieu de culture final.

Cellules:

Pour les cultures mères du laboratoire:

- type et source des cellules, et antécédents dans le laboratoire d'essai;
- caractéristiques du caryotype et/ou nombre modal de chromosomes;
- méthodes d'entretien des cultures cellulaires;
- absence de mycoplasmes;
- temps de doublement des cellules.

Conditions de l'essai:

- justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris données concernant la cytotoxicité et les limites de solubilité, par exemple;
- composition du milieu, concentration de CO₂, degré d'humidité;
- concentration du produit chimique d'essai sous la forme de sa concentration finale dans le milieu de culture (par exemple, en µg ou mg/ml ou mM du milieu de culture);
- concentration (et/ou volume) de solvant et de produit chimique d'essai ajoutée au milieu de culture;
- température d'incubation;
- temps d'incubation;
- durée du traitement;
- densité des cellules pendant le traitement;

- type et composition du système d'activation métabolique (source du S9, méthode de préparation du mélange S9, concentration ou volume de mélange S9 et de S9 dans le milieu de culture final, contrôles de la qualité du S9);
- substances témoins positives et négatives, concentrations finales pour chacune des conditions de traitement;
- durée de la période d'expression (avec le nombre de cellules déposées et de repiquages et les programmes de nutrition, le cas échéant);
- identité de l'agent sélectif et sa concentration;
- pour l'essai MLA, la version utilisée (méthode de diffusion en gélose ou micropuits) doit être précisée;
- critères d'acceptabilité des essais;
- méthodes utilisées pour dénombrer les cellules viables et les cellules mutantes;
- méthodes utilisées pour mesurer la cytotoxicité;
- toute information supplémentaire concernant la cytotoxicité et la méthode utilisée;
- temps d'incubation après étalement sur une plaque;
- définition des colonies dont le type et la taille sont pris en compte (y compris les critères pour les «petites» et «grandes» colonies, le cas échéant);
- critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque;
- méthodes utilisées pour déterminer le pH et l'osmolalité, si cela a été effectué, et la précipitation, si cela est pertinent.

Résultats:

- nombre de cellules exposées et nombre de cellules repiquées pour chaque culture;
- paramètres de toxicité (CRT pour l'essai MLA et SR pour l'essai sur TK6);
- signes de précipitation et moment de la détermination;
- nombre de cellules étalées sur plaque dans un milieu sélectif et dans un milieu non sélectif;
- nombre de colonies dans un milieu non sélectif et nombre de colonies résistantes dans un milieu sélectif, et fréquences de mutants correspondantes;
- taille des colonies pour les témoins négatifs et positifs et, si le produit chimique est positif, au moins une concentration, et fréquences des mutants correspondantes;
- relation concentration-réponse, si possible;

- données relatives aux témoins négatifs (solvants) et positifs (concentrations et solvants) concomitants;
- données relatives aux témoins négatifs (solvants) et positifs (concentrations et solvants) historiques, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts-types, nombre d'essais sur lesquels les témoins historiques sont basés;
- analyses statistiques (pour chaque culture et chaque lot de répliquats, le cas échéant), et valeurs p, le cas échéant; et pour l'essai MLA, évaluation du FEG.

Discussion des résultats.

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3): 185-190.
- (2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), *Environ. Mol. Mutagen.*, 40 (4): 292-299.
- (3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, *Mutation Res.*, 540: 127-140.
- (4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (1): 1-5.
- (5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse

Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, *Mutation. Res.*, 627 (1): 36-40.

- (6) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, N° 234, OECD, Paris.
- (7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. *Mutation, Res.*, 746 (1): 21-28.
- (8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. *Mutation Res.*, 493 (1-2): 101-114.
- (9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96-105.
- (10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. National. Academy. Sci. USA*, 87 (1): 51-55.
- (11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/-} Leads to TK^{-/-} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169-181.
- (12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{-/-} Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): 237-242.
- (13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161-174.
- (14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143-153.

- (15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77-87.
- (16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation. Res.*, 374 (1): 89-98.
- (17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinogen.*, 28 (4): 203-14.
- (18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89-95.
- (19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/−}-3.7.2C) Forward Mutation Assay. In *Protocols in Genotoxicity Assessment* A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.
- (20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, *Mutation Res.*, 634 (1-2): 177-183.
- (21) Nessler, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.*, 49 (6): 439-452.
- (22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879-886.
- (23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297-305.
- (24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147-204.

- (25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.*, 626 (1-2): 185-190.
- (26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Academy Sci.*, 76: 673-680.
- (27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK^{+/-} - Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutation Res.*, 59(1): 61-108.
- (28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 147 (5): 243-253.
- (29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181-193.
- (30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127-131.
- (31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 55 (1): 35-42.
- (32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK^{+/-} Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation. Res.*, 373 (2): 157-165.
- (33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutagen.*, 19 (4): 263-268.
- (34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411-416.

- (35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2-3): 162-176.
- (36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer. Res.*, 55 (1): 12-15.
- (37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).
- (38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. *Springer Protocols: Methods in Molecular Biology* 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.
- (39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- (40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467-485.
- (41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *ATLA*, 33 (3): 261-287.
- (42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4-5): 287-294.
- (43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347-364.

- (44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173-215.
- (45) Natarajan, A.T., Tate, A.D., Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): 83-90.
- (46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277-290.
- (47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65
- (48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175-177.
- (49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241-261.
- (51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): 51-59.
- (52) PNUE. (2001). Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants, Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE).
- (53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In:

Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L. and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.

- (54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5 (6): 795-801.
- (55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. *Mutation Res.*, 652 (2): 122-130.
- (56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. *Mutation Res.*, 741 (1-2): 32-56.
- (58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 54 (1): 36-43.
- (59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Available at: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 52 (5): 373-384.
- (61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK^{-/-}) Mutants from L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 85 (5): 363-378.
- (62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an

Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. *Mutation Res.*, 216 (1): 9-17.

- (63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. *Anal. Biochem.*, 110 (1): 1-8.
- (64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, 723 (2): 87-90.
- (65) Ryan T.P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.
- (66) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 199.), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

Appendice 1

DÉFINITIONS

Aneugène: produit chimique ou processus qui, via des interactions avec les composants de la cellule mitotique ou méiotique lors de la division cellulaire, provoque la formation de cellules ou d'organismes aneuploïdes.

Aneuploïdie: tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes, d'un seul ou de plusieurs chromosomes, mais non d'un ou de plusieurs jeux de chromosomes (polyploïdie).

Clastogène: produit chimique ou processus induisant des aberrations chromosomiques structurelles dans des populations cellulaires ou des organismes.

Croissance en suspension (CS): facteur d'augmentation du nombre de cellules au cours du traitement et des phases d'expression de l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA). On calcule la CS en multipliant le facteur d'augmentation le Jour 1 par le facteur d'augmentation le Jour 2 pour le traitement de courte durée (3 ou 4 heures). Dans le cas d'un traitement sur 24 heures, la CS correspond au facteur d'augmentation durant le traitement de 24 heures multiplié par les facteurs d'augmentation des jours d'expression 1 et 2.

Croissance relative en suspension (CRS): pour l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA), augmentation relative sur deux jours du nombre total de cellules en suspension dans une culture d'essai comparée à l'augmentation totale sur deux jours du nombre de cellules en suspension dans le témoin négatif/avec solvant (Clive et Spector, 1975). La CRS doit comprendre la croissance relative de la culture d'essai comparée à celle du témoin négatif/avec solvant durant la période de traitement.

Croissance relative totale (CRT): la CRT est utilisée pour mesurer la toxicité liée au traitement dans l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA). Elle mesure la croissance relative (par rapport au témoin avec véhicule) des cultures d'essai durant les phases de traitement, d'expression sur deux jours et de clonage de sélection des mutants de l'essai. La CRS de chaque culture d'essai est multipliée par l'efficacité de clonage relative de la culture d'essai au moment de la sélection de mutants et exprimée par rapport à l'efficacité de clonage du témoin négatif/avec solvant (Clive et Spector, 1975).

Cytotoxicité: pour les essais visés par la présente méthode d'essai, la cytotoxicité correspond à une baisse de la croissance relative totale (CRT) ou de la survie relative (SR) pour l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA) et l'essai sur TK6, respectivement.

Délai d'expression phénotypique: délai après traitement au bout duquel l'altération

génique est fixée dans le génome et tous les produits géniques préexistants sont épuisés au point que le caractère phénotypique est modifié.

Efficacité de clonage: pourcentage de cellules étalées sur plaque à une faible densité qui sont capables de se développer pour former une colonie dénombrable.

Fraction S9 de foie: surnageant d'homogénat de foie centrifugé à 9 000 g (extrait de foie cru)

Fréquence des mutants (FM): nombre de mutants observés divisé par le nombre de cellules viables.

Génotoxique: terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, adduits, remaniements, mutations, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Mélange S9: mélange de fraction S9 de foie et de cofacteurs nécessaires à l'activité des enzymes métaboliques.

Mutagène: qui produit une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Mutagènes décalant le cadre de lecture: produits chimiques entraînant l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de bases dans la molécule d'ADN.

Mutagènes provoquant la substitution de paires de bases: produits chimiques qui entraînent le remplacement d'une ou de plusieurs paires de bases de l'ADN.

Mutation directe: mutation de gène de la forme parentale en une forme mutante, qui engendre une modification ou une perte de l'activité enzymatique ou de la fonction de la protéine codée.

Produit chimique: une substance ou un mélange.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai.

Recombinaison mitotique: durant la mitose, recombinaison entre chromatides homologues pouvant induire des cassures double brin de l'ADN ou une perte d'hétérozygotie.

Survie relative (SR): la SR sert à mesurer la cytotoxicité liée au traitement dans l'essai sur TK6. Elle correspond à l'efficacité de clonage relative (ECR) des cellules étalées sur plaques immédiatement après le traitement cellulaire, ajustée en fonction d'une

éventuelle perte de cellules en cours de traitement, par rapport à l'efficacité de clonage du témoin négatif.

Témoin avec solvant: terme générique désignant les cultures témoins recevant uniquement le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai.

Témoins non traités: cultures ne recevant aucun traitement (ni produit chimique d'essai ni solvant) mais préparées parallèlement et de la même façon que les cultures exposées au produit chimique d'essai.

Appendice 2

FORMULES

Cytotoxicité

Pour les deux versions (gélose et micropuits) de l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA)

La cytotoxicité est définie par la croissance relative totale (CRT) qui comprend la croissance relative en suspension (CRS) durant la période d'expression de 2 jours et l'efficacité de clonage relative (ECR) obtenue au moment de la sélection de mutants. La CRT, la CRS et l'ECR sont toutes exprimées en pourcentage.

Calcul de la CRS: La croissance en suspension un (CS_1) correspond au taux de croissance entre le Jour 0 et le Jour 1 (concentration cellulaire au Jour 1 / concentration cellulaire au Jour 0) et la croissance en suspension deux (CS_2) correspond au taux de croissance entre le Jour 1 et le Jour 2 (concentration cellulaire au Jour 2 / concentration cellulaire au Jour 1). La CRS correspond à la CS totale ($CS_1 \times CS_2$) pour la culture traitée comparée au témoin non traité/avec solvant. C'est-à-dire: $CRS = [CS_1 \text{ (essai)} \times CS_2 \text{ (essai)}] / [CS_1 \text{ (témoin)} \times CS_2 \text{ (témoin)}]$. La CS_1 doit être calculée à partir de la concentration cellulaire initiale utilisée au début du traitement des cellules. La CRS permet de tenir compte d'une éventuelle cytotoxicité différentielle se manifestant dans la ou les cultures d'essai durant le traitement des cellules.

L'ECR est l'efficacité de clonage relative de la culture d'essai comparée à l'efficacité de clonage relative du témoin non traité/avec solvant obtenue au moment de la sélection des mutants.

Croissance relative totale (CRT): $CRT = CRS \times ECR$

TK6

Survie relative (SR):

La cytotoxicité est évaluée par la survie relative, c'est-à-dire l'efficacité de clonage (EC) des cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement cellulaire, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement, par rapport à l'efficacité de clonage sur les témoins négatifs (à qui l'on attribue une survie de 100 %). L'ajustement pour la perte de cellules durant le traitement peut être calculé de la manière suivante:

$$EC \text{ ajustée} = EC \times \frac{\text{Nombre de cellules à la fin du traitement}}{\text{Nombre de cellules au début du traitement}}$$

La SR pour une culture traitée par un produit chimique d'essai est calculée comme suit:

$$SR = \frac{EC \text{ ajustée pour la culture traitée}}{EC \text{ ajustée pour le témoin avec solvant}} \times 100$$

Fréquence des mutants pour les essais MLA et TK6

La fréquence des mutants (FM) correspond à l'efficacité de clonage de colonies de mutants dans un milieu sélectif (EC_M), ajustée en fonction de l'efficacité de clonage dans un milieu non sélectif mesurée au moment de la sélection des mutants (EC_V). C'est-à-dire, $FM = EC_M/EC_V$. Le calcul de ces deux efficacités de clonage est décrit ci-dessous pour les méthodes avec gélose et avec micropuits.

Version avec diffusion en gélose de l'essai MLA: Dans la version de l'essai MLA utilisant de la gélose molle, le nombre de colonies sur la plaque de sélection des mutants (C_M) et le nombre de colonies sur la plaque non sélectionnée ou servant à déterminer l'efficacité de clonage (nombre viable) (C_V) sont obtenus par comptage direct des clones. Lorsque 600 cellules sont étalées sur les plaques afin de déterminer l'efficacité de clonage (EC), les plaques destinées à la sélection des mutants (EC_M) et les plaques non sélectionnées ou servant à mesurer l'efficacité de clonage (nombre viable) (EC_V) et que 3×10^6 cellules sont utilisées pour la sélection des mutants,

$$EC_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$EC_V = C_V / 600$$

Version avec micropuits pour les essais MLA et sur TK6: dans la version avec micropuits de l'essai MLA, la C_M et la C_V sont déterminées comme étant le produit du nombre total de micropuits (TM) et du nombre probable de colonies par puits (P) sur les plaques micropuits.

$$C_M = P_M \times TM_M$$

$$C_V = P_V \times TM_V$$

À partir du terme zéro de la distribution de Poisson (Furth *et al.*, 1981), on obtient P de la façon suivante:

$$P = -\ln (PV / TM)$$

Où, PV désigne les puits vides et TM le total des puits. Par conséquent,

$$EC_M = C_M / T_M = (P_M \times TM_M) / T_M$$

$$EC_V = C_V / T_V = (P_V \times TM_V) / T_V$$

Pour la version de l'essai MLA utilisant les micropuits, la fréquence des mutants dans les petites colonies et les grandes colonies sera calculée de manière identique, en utilisant le nombre pertinent de puits vides pour les petites et les grandes colonies.

Pour l'essai sur TK6, la fréquence des mutants des petites et des grandes colonies est calculée en fonction des mutants apparaissant précocement et des mutants apparaissant tardivement.

B.68 MÉTHODE D'ESSAI D'EXPOSITION DE COURTE DURÉE *IN VITRO* POUR L'IDENTIFICATION DES PRODUITS CHIMIQUES i) PROVOQUANT DES LÉSIONS OCULAIRES GRAVES OU ii) NE RELEVANT D'AUCUNE CLASSIFICATION POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSION OCULAIRE GRAVE

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 491 (2017) de l'OCDE. La méthode d'exposition de courte durée (*Short Time Exposure*, STE) est une méthode d'essai *in vitro* qui, dans certaines circonstances et assortie de restrictions spécifiques, peut être utilisée pour la classification des dangers et l'étiquetage des produits chimiques (substances et mélanges) provoquant des lésions oculaires graves ou ne relevant d'aucune classification pour lésion oculaire grave ou irritation oculaire, conformément au Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1) et au règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (ci-après le «règlement CLP»)¹.
2. Pendant de nombreuses années, les dangers potentiels pour l'œil que présentent les produits chimiques ont été principalement évalués par des tests *in vivo* effectués sur des yeux de lapins (méthode d'essai B.5, équivalente à la ligne directrice 405 de l'OCDE). Il est généralement admis que dans notre horizon de prévision, aucun essai unique d'irritation oculaire *in vitro* ne pourra remplacer le test *in vivo* sur œil de lapin pour établir le degré d'irritation ou de lésion oculaire grave provoqué par les différentes classes de produits chimiques. Cependant, la combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) pourrait remplacer le test sur les yeux de lapin (2). L'approche «top-down» est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique soit fortement irritant ou puisse provoquer de graves lésions oculaires, alors que l'approche «bottom-up» est conçue pour être appliquée quand, au vu des informations existantes, un produit chimique devrait a priori ne pas causer une

¹ Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1

irritation oculaire suffisante pour nécessiter une classification. Alors que la méthode STE n'est pas jugée valable pour remplacer purement et simplement la méthode d'essai *in vivo* sur œil de lapin, son utilisation est acceptable comme élément d'une stratégie d'essai à plusieurs niveaux visant à établir une classification et un étiquetage réglementaires, telle que l'approche «top-down»/«bottom-up», pour identifier sans expérimentation supplémentaire les produits chimiques (i) provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP) et (ii) les produits chimiques (à l'exception des substances hautement volatiles et de tous les produits solides autres que les tensioactifs) qui ne nécessitent aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave («sans catégorie» du SGH de l'ONU/du règlement CLP) (1) (2). Toutefois, un produit chimique qui, avec la méthode STE, n'est pas identifié comme provoquant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP) ou comme ne relevant d'aucune classification («sans catégorie» du SGH de l'ONU/du règlement CLP) nécessiterait d'être soumis à des essais complémentaires visant à établir une classification définitive. En outre, les autorités réglementaires compétentes devraient être consultées avant de mettre en œuvre la méthode STE dans une approche «bottom-up» dans le cadre d'autres systèmes de classification que le SGH de l'ONU/du règlement CLP. Le choix de la méthode d'essai la plus pertinente et l'utilisation de cette méthode d'essai doivent être envisagés dans le contexte du Document d'orientation de l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation pour les lésions oculaires sévères et l'irritation de l'œil (14).

3. L'objet de la présente méthode d'essai est de décrire les procédures utilisées pour évaluer le danger potentiel qu'un produit chimique d'essai présente pour l'œil, mesuré par le caractère cytotoxique du produit chimique lors d'un test d'exposition de courte durée (STE). L'effet cytotoxique des produits chimiques sur les cellules épithéliales cornéennes est un mécanisme d'action important qui provoque des lésions de l'épithélium cornéen et une irritation oculaire. Dans la méthode d'essai STE, la viabilité cellulaire est évaluée par un dosage quantitatif des cristaux de formazan bleu extraits des cellules et produits par les cellules vivantes lors de la conversion enzymatique du colorant vital MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium), encore appelé Bleu de thiazol (3). La viabilité cellulaire observée est comparée à celle du témoin avec solvant (viabilité relative) et utilisée comme estimation du danger potentiel pour les yeux que présente le produit chimique d'essai. Les produits chimiques d'essai sont classés dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP lorsqu'une viabilité cellulaire inférieure ou égale à ($\leq$) 70% est observée aux deux concentrations testées (5 % et 0,05 %). À l'inverse, les produits chimiques pour lesquels la viabilité cellulaire est supérieure à ($>$) 70 % aux

deux concentrations testées (5 % et 0,05 %) sont classés «sans catégorie» selon le système SGH/le règlement CLP.

4. Dans la présente méthode d'essai, le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode STE pour les essais sur des substances et/ou mélanges. Les définitions sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

5. La présente méthode d'essai est basée sur un protocole expérimental mis au point par Kao Corporation (4). Ce protocole a fait l'objet de deux études de validation différentes: l'une par le Comité de validation de la Société japonaise pour les méthodes alternatives aux expérimentations animales (JSAAE) (5), l'autre par le Centre japonais de validation des méthodes alternatives (JaCVAM) (6). Un examen par les pairs a été conduit par le NICEATM/ICCVAM sur la base des rapports des études de validation et des documents de référence (BRD) relatifs à la méthode d'essai (7).
6. Lors de l'utilisation de la méthode d'essai STE pour l'identification de produits chimiques (substances et mélanges) pouvant provoquer de graves lésions oculaires (Catégorie 1 du SGH de l'ONU (1)/du règlement CLP), les données obtenues pour 125 produits chimiques (substances et mélanges) ont démontré une précision globale de la méthode de 83 % (104/125), un taux de faux positifs de 1 % (1/86) et un taux de faux négatifs de 51 % (20/39) par comparaison avec les données obtenues avec la méthode *in vivo* sur œil de lapin (7). Le taux de faux négatif observé n'est pas préoccupant dans le contexte de cet essai, étant donné que tous les produits chimiques qui induisent une viabilité cellulaire $\leq 70\%$ à une concentration de 5 % et $> 70\%$ à une concentration de 0,05 % devront être testés à nouveau à l'aide de méthodes d'essai *in vitro* dûment validées ou, en dernier recours, avec la méthode *in vivo* sur œil de lapin, en fonction des exigences de la réglementation et selon la démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve actuellement recommandée (1) (8). Ce sont principalement des substances mono-constituant qui ont été testées, même si l'on dispose également d'un nombre limité de données relatives à l'essai de mélanges. La méthode est néanmoins techniquement applicable aux essais de substances multi-constituants et de mélanges. Toutefois, avant d'appliquer la présente méthode d'essai à un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si et, dans l'affirmative, pourquoi les résultats peuvent être acceptables dans le cadre réglementaire imposé. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent

que le mélange doit être testé. Aucune autre limite particulière de la méthode d'essai STE n'a été mise en évidence lors de son application pour l'identification de produits chimiques de la catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP. L'application de cette méthode d'essai peut être envisagée pour tester des produits chimiques, une viabilité cellulaire $\leq 70\%$ aux deux concentrations (5 % et 0,05 %) étant alors considérée comme l'indicateur d'un effet provoquant des lésions oculaires graves qui justifie de classer le produit chimique d'essai dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP sans mener d'essai complémentaire.

7. Lors de l'utilisation de la méthode d'essai STE pour l'identification de produits chimiques (substances et mélanges) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave («sans catégorie» du SGH de l'ONU/du règlement CLP), les données obtenues pour 130 produits chimiques (substances et mélanges) ont démontré une précision globale de la méthode de 85 % (110/130), un taux de faux négatifs de 12 % (9/73) et un taux de faux positifs de 19 % (11/57) par comparaison avec les résultats obtenus avec la méthode *in vivo* sur œil de lapin (7). Si l'on exclut des données celles relatives aux substances hautement volatiles et aux substances solides autres que les tensioactifs, la précision globale est de 90 % (92/102), le taux de faux négatifs est de 2 % (1/54) et le taux de faux positifs est de 19 % (9/48) (7). En conséquence, la limite potentielle de la méthode d'essai STE lors d'une utilisation pour l'identification de substances ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave («sans catégorie» du SGH de l'ONU/du règlement CLP) est un taux élevé de faux négatifs pour i) les substances hautement volatiles présentant une pression de vapeur supérieure à 6 kPa et pour ii) les produits chimiques solides (substances et mélanges) en dehors des tensioactifs et mélanges composés uniquement de tensioactifs. Ces produits chimiques sont exclus du domaine d'applicabilité de la méthode d'essai STE (7).
8. Outre les données relatives aux produits chimiques mentionnés aux paragraphes 6 et 7, les ensembles de données générés avec la méthode d'essai STE comprennent des données internes pour 40 mélanges, lesquelles, par comparaison avec les données issues des essais selon la méthode *in vivo* de Draize, démontrent une précision de la méthode de 88 % (35/40), un taux de faux positifs de 50 % (5/10), et un taux de faux négatifs de 0 % (0/30) pour l'analyse de mélanges ne relevant d'aucune classification selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP (9). La méthode d'essai STE est donc applicable dans une approche «bottom-up» pour l'identification de mélanges «sans catégorie» dans le SGH de l'ONU/le règlement CLP, à l'exception des mélanges solides autres que ceux composés uniquement de tensioactifs, par extension des limitations applicables aux substances solides exprimées au paragraphe 7. De plus, les

mélanges qui contiennent des substances présentant une pression de vapeur supérieure à 6 kPa doivent être analysés avec attention pour éviter toute sous-évaluation et leur cas doit être justifié un à un.

9. La méthode d'essai STE ne peut être utilisée pour l'identification de produits chimiques relevant de la catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP ou de la catégorie 2A (irritation oculaire) ou 2B (légère irritation oculaire) du SGH de l'ONU, en raison du nombre considérable de produits chimiques de la catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP sous-évalués dans les catégories 2, 2A ou 2B, et de produits chimiques ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU/du règlement CLP surévalués dans les catégories 2, 2A ou 2B (7). Aussi pourrait-il être nécessaire de mener des essais complémentaires avec une autre méthode adaptée.
10. La méthode d'essai STE convient pour des produits chimiques d'essai dissous ou en suspension uniforme pendant au moins 5 minutes dans du sérum physiologique, dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 5 % dans une solution saline, ou dans une huile minérale. La méthode d'essai STE ne convient pas pour des produits chimiques insolubles ou qui ne peuvent pas être en suspension uniforme pendant au moins 5 minutes dans du sérum physiologique, dans du DMSO à 5% en solution saline, ou dans une huile minérale. L'utilisation d'une huile minérale dans la méthode d'essai STE est possible car il s'agit d'une exposition de courte durée. En conséquence, la méthode d'essai STE convient pour prévoir le potentiel de dangerosité pour les yeux de produits chimiques d'essai insolubles dans l'eau (alcools gras à longue chaîne ou cétones, par exemple), à condition que ces produits chimiques soient solubles dans au moins l'un des trois solvants proposés ci-avant (4).
11. Dans la présente méthode d'essai, le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est testé¹¹ et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode d'essai STE aux substances et/ou aux mélanges.

PRINCIPE DE L'ESSAI

12. La méthode d'essai STE est un test *in vitro* de cytotoxicité, réalisé sur une monocouche confluente de fibroblastes de cornée de lapin du Statens Seruminstitut

¹¹ En juin 2013, la Réunion conjointe est convenue que, dans la mesure du possible, le terme « produit chimique d'essai » devrait désormais être employé de façon plus cohérente pour désigner ce qui est soumis à l'essai dans les futures méthodes d'essai.

(SIRC), cultivés sur des plaques microtitres 96 puits (4). Après 5 minutes d'exposition à un produit chimique d'essai, on détermine quantitativement la cytotoxicité en mesurant, à l'aide du test MTT (4), la viabilité relative des cellules SIRC. L'observation d'une diminution de la viabilité cellulaire est utilisée pour prédire les effets indésirables potentiels pouvant provoquer des lésions oculaires.

13. Il a été signalé que 80 % d'une solution appliquée sur l'œil d'un lapin est excrétée via le sac conjonctival dans les trois à quatre minutes, tandis que plus de 80 % d'une solution appliquée sur l'œil humain est excrétée en une à deux minutes (10). La méthode d'essai STE vise à s'approcher de ces durées d'exposition et prend comme effet mesuré la cytotoxicité pour évaluer les lésions subies par les cellules SIRC après cinq minutes d'exposition au produit chimique d'essai.

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

14. Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai STE décrite dans la présente méthode d'essai, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en classant correctement les onze substances recommandées au tableau 1. Ces substances ont été sélectionnées pour représenter l'ensemble de la gamme des réponses correspondant à des lésions oculaires graves ou à une irritation oculaire, sur la base des résultats obtenus *in vivo* avec le test sur œil de lapin (LD 405) et du système de classification SGH de l'ONU/du règlement CLP (1). La disponibilité des substances dans le commerce, l'existence de données de référence *in vivo* de bonne qualité, et l'existence de données de bonne qualité issues de la méthode d'essai STE *in vitro* constituent d'autres critères de sélection (3). Si un des produits chimiques de la liste n'est pas disponible ou si cela se justifie, on pourra utiliser un autre produit chimique pour lequel des données de références acceptables *in vitro* et *in vivo* sont disponibles, à condition de retenir les mêmes critères que ceux retenus dans la présente Ligne directrice.

Tableau 1: Liste des produits chimiques d'épreuve de compétence

Substance	N° CAS	Classe chimique ¹	État physique	Cat. SGH ONU/CLP <i>In vivo</i> ²	Solvant dans essai STE	Cat. SGH ONU/CLP STE
Chlorure de benzalkonium (10%, aqueux)	8001-54-5	Composé onium	Liquide	Catégorie 1	Solution saline	Catégorie 1
Triton X-100 (100%)	9002-93-1	Éther	Liquide	Catégorie 1	Solution saline	Catégorie 1

Acid Red 92	18472-87-2	Hétérocycle; composé bromé; composé chloré	Solide	Catégorie 1	Solution saline	Catégorie 1
Hydroxyde de sodium	1310-73-2	Alcali; produit chimique inorganique	Solide	Catégorie 1 ³	Solution saline	Catégorie 1
Butyrolactone	96-48-0	Lactone; hétérocycle	Liquide	Catégorie 2A (Catégorie 2 dans le CLP)	Solution saline	Aucune prédiction ne peut être faite
Octan-1-ol	111-87-5	Alcool	Liquide	Catégorie 2A/B ⁴ (Catégorie 2 dans le CLP)	Huile minérale	Aucune prédiction ne peut être faite
Cyclopentanol	96-41-3	Alcool; hydrocarbure, cyclique	Liquide	Catégorie 2A/B ⁵ (Catégorie 2 dans le CLP)	Solution saline	Aucune prédiction ne peut être faite
Acétate de 2- éthoxyéthyle	111-15-9	Alcool; éther	Liquide	Sans catégorie	Solution saline	Sans catégorie
Dodécane	112-40-3	Hydrocarbure, acyclique	Liquide	Sans catégorie	Huile minérale	Sans catégorie
Méthylisobutylcéto ne	108-10-1	Cétone	Liquide	Sans catégorie	Huile minérale	Sans catégorie
Sulfate de n,n- diméthylguanidine	598-65-2	Amidine; composé du soufre	Solide	Sans catégorie	Solution saline	Sans catégorie

Abréviations: Numéro CAS = Numéro d'enregistrement auprès du *Chemical Abstracts Service*

¹Les classes chimiques ont été déterminées d'après les informations obtenues dans les publications antérieures du NICEATM ou, si celles-ci étaient indisponibles, auprès de la National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®) (via ChemIDplus® [National Library of Medicine], disponible à l'adresse <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>) et avec la détermination des structures du NICEATM.

²Basé sur les résultats obtenus avec le test *in vivo* sur œil de lapin (ligne directrice 405 de l'OCDE) et sur le SGH de l'ONU/le règlement CLP (1)

³La classification dans la catégorie 1 est fondée sur le potentiel corrosif pour la peau d'une solution d'hydroxyde de sodium à 100 % (sur la liste des produits chimiques d'épreuve potentiellement corrosifs pour la peau dans la ligne directrice 435 de l'OCDE) et sur les critères de classification en catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP (1).

⁴La classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 2 animaux sur 6 ou 4 animaux sur 6 le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. Les données *in vivo* sont issues de 2 études menées chacune sur 3 animaux. Dans une étude, des effets étaient encore visibles chez deux des trois animaux le

septième jour, d'où le classement en catégorie 2A (11), tandis que dans la seconde étude tous les effets mesurés chez les trois animaux avaient disparu le septième jour, d'où le classement en catégorie 2B (12).

⁵La classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 1 animal sur 3 ou 2 animaux sur 3 le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. L'étude *in vivo* a été menée sur 3 animaux. Tous les effets, sauf l'opacité de la cornée et la rougeur conjonctivale chez un animal, avaient disparu le septième jour ou avant. L'animal dont les effets n'avaient pas disparu le septième jour présentait un score d'opacité cornéenne de 1 et un score pour la rougeur conjonctivale de 1 le septième jour, et les deux effets avaient disparu au quatorzième jour (11).

PROCÉDURE

Préparation de la monocouche cellulaire

15. La lignée cellulaire de cornée de lapin SIRC est utilisée dans la méthode d'essai STE. Il est recommandé d'acquérir les cellules SIRC auprès d'une banque de cellules reconnue, par exemple la lignée CCL60 auprès de l'*American Type Culture Collection*.
16. Les cellules SIRC sont cultivées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5 % CO₂, dans un flacon contenant un milieu de culture constitué de milieu essentiel minimal d'Eagle (MEM) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-glutamine, 50-100 unités/ml de pénicilline et 50-100 µg/ml de streptomycine. Les cellules devenues confluentes dans le flacon de culture doivent être séparées à l'aide d'une solution de trypsine-acide éthylènediaminetétraacétique, avec ou sans raclette. Les cellules sont repiquées dans un flacon de culture (par exemple, 2 ou 3 repiquages) avant d'être utilisées dans les tests de routine et ne doivent pas être utilisées après plus de 25 repiquages après décongélation.
17. Les cellules prêtes à être utilisées dans l'essai STE sont préparées à la densité adaptée et ensemencées dans une plaque microtitre 96 puits. La densité d'ensemencement recommandée est de $6,0 \times 10^3$ cellules par puits lorsque les cellules sont utilisées quatre jours après l'ensemencement, ou $3,0 \times 10^3$ cellules par puits lorsque les cellules sont utilisées cinq jours après l'ensemencement, pour un volume de culture de 200 µl. Les cellules utilisées dans le test STE ensemencées dans un milieu de culture à la densité adéquate atteignent une confluence supérieure à 80 % au moment de l'essai, c'est-à-dire quatre ou cinq jours après l'ensemencement.

Application des produits chimique d'essai et des substances témoins

18. Il est recommandé de commencer par dissoudre ou suspendre le produit chimique d'essai dans du sérum physiologique. Si le produit chimique d'essai est peu soluble, insoluble ou ne peut pas être mis en suspension uniforme pendant au moins 5 minutes

dans du sérum physiologique, du DMSO à 5 % (N°CAS 67-68-5) dans une solution saline peut alors être choisi comme solvant. Si le produit chimique ne peut être dissous ou mis en suspension uniforme pendant 5 minutes, soit dans du sérum physiologique, soit dans du DMSO à 5 % dans une solution saline, le troisième solvant possible est une huile minérale (N°CAS 8042-47-5).

19. Les produits chimiques d'essai sont dissous ou uniformément suspendus à une concentration de 5 % (m/v) dans le solvant choisi, puis une série de dilutions de facteur 10 est réalisée jusqu'à obtention de concentration à 0,5 % et 0,05 %. Chaque produit chimique est testé aux deux concentrations (5 % et 0,05 %). Les cellules cultivées sur la plaque 96 puits sont exposées à 200 µl/puits de la solution (ou suspension) de produit chimique à 5 %, ou à 0,05 %, pendant 5 minutes à température ambiante. Les produits chimiques (substances mono-constituant, ou substances ou mélanges multi-constituants) sont considérés comme purs et dilués ou suspendus selon la présente méthode, quel que soit leur degré de pureté.
20. Le milieu de culture décrit au paragraphe 16 est utilisé comme témoin pour chaque plaque de chaque répétition. En outre, les cellules sont aussi exposées, pour chaque plaque de chaque répétition, à des échantillons témoins de solvant. Il a été confirmé que les solvants indiqués au paragraphe 18 n'ont aucun effet indésirable sur la viabilité des cellules SIRC.
21. Dans la méthode d'essai STE, du laurylsulfate de sodium (SLS) à 0,01 % dans une solution physiologique est utilisé comme témoin positif pour chaque plaque de chaque répétition. Afin de calculer la viabilité cellulaire en présence du témoin positif, chaque plaque de chaque répétition comprend aussi un témoin avec une solution physiologique.
22. Un blanc est nécessaire afin de déterminer la compensation de densité optique par la solution tampon, et ne contient que le tampon phosphate en solution physiologique, sans calcium ni magnésium (PBS-) ni cellule.
23. Chaque échantillon (produit chimique d'essai à 5 % ou 0,05 %, témoin avec milieu, témoin avec solvant et témoin positif) est testé avec trois réplicats pour chaque répétition, en exposant les cellules à 200 µl du produit chimique approprié (d'essai ou témoin) pendant cinq minutes à température ambiante.
24. Des substances étalons peuvent s'avérer utiles pour évaluer le potentiel d'irritation oculaire de produits chimiques inconnus relevant de classes spécifiques de substances chimiques ou de produits, ou encore pour évaluer le potentiel d'irritation relatif d'un irritant oculaire dans une gamme spécifique de réactions d'irritation.

Mesures de la viabilité cellulaire

25. Après l'exposition, les cellules sont rincées deux fois dans 200 µl de PBS, puis 200 µl de solution MTT (0,5 mg MTT/ml de milieu de culture) sont ajoutés. Après deux heures de réaction dans un incubateur (37 °C, 5 % CO₂), la décantation de la solution de MTT est effectuée, le MTT formazan est extrait par l'ajout de 200 µl de 40 mM isopropanol-acide chlorhydrique pendant 60 minutes dans le noir à température ambiante, et l'absorbance de la solution de MTT formazan est mesurée à 570 nm avec un lecteur de plaque. Il n'y a interférence entre le produit chimique d'essai et le MTT (due à des colorants ou à des réducteurs directs du MTT) que si une quantité significative de produit chimique d'essai perdure dans le système d'essai après le rinçage, ce qui est le cas avec la cornée humaine reconstituée en 3D ou avec les tissus de l'épiderme humain reconstitués, mais est sans incidence pour les cultures cellulaires en 2D utilisées dans la méthode d'essai STE.

Interprétation des résultats et modèle de prévision

26. Les valeurs de densité optique (DO) obtenues pour chaque produit chimique d'essai sont ensuite utilisées pour calculer la viabilité cellulaire exprimée relativement à celle du témoin avec solvant, fixée à 100%. La viabilité cellulaire relative est exprimée en pourcentage et obtenue en divisant la DO du produit chimique d'essai par la DO du témoin avec solvant, après soustraction de la DO du blanc de chaque valeur.

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{(DO_{570} \text{ produit chimique d'essai}) - (DO_{570} \text{ blanc})}{(DO_{570} \text{ témoin avec solvant}) - (DO_{570} \text{ blanc})} \times 100$$

De même, la viabilité cellulaire de chaque témoin avec solvant est exprimée en pourcentage et s'obtient en divisant la DO de chaque témoin avec solvant par la DO du témoin avec milieu, après soustraction de la DO du blanc de chaque valeur.

27. Trois répétitions indépendantes, chacune contenant trois réplicats (soit 9 puits), sont réalisées. On utilise la moyenne arithmétique des trois puits pour chaque produit chimique d'essai et chaque témoin de solvant dans chaque répétition indépendante pour calculer la moyenne arithmétique de la viabilité cellulaire relative. La moyenne arithmétique finale de la viabilité cellulaire est calculée à partir des trois répétitions indépendantes.
28. Les valeurs seuils de la viabilité cellulaire pour l'identification des produits chimiques testés induisant des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP) ou ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave («Sans catégorie» du SGH de l'ONU/du règlement CLP) sont fournies ci-après.

Tableau 2: Modèle de prédiction de la méthode d'essai STE

Viabilité cellulaire		Classification SGH ONU/CLP	Applicabilité
À 5%	À 0,05%		
> 70%	> 70%	Sans Catégorie	Substances et mélanges, à l'exception: i) des substances hautement volatiles présentant une pression de vapeur supérieure à 6 kPa ¹ et ii) des produits chimiques (substances et mélanges) solides sauf les tensioactifs et les mélanges composés uniquement de tensioactifs
≤ 70%	> 70%	Aucune prédiction ne peut être faite	Non applicable
≤ 70%	≤ 70%	Catégorie 1	Substances et mélanges ²

¹ Les mélanges contenant des substances présentant une pression de vapeur supérieure à 6kPa doivent être analysés avec attention pour éviter toute sous-évaluation, et leur cas doit être justifié un à un.

² Sur la base de résultats obtenus principalement avec des substances mono-constituant, bien que des données limitées soient aussi disponibles pour les essais portant sur des mélanges. L'utilisation de la méthode d'essai est néanmoins techniquement possible pour les substances multi-constituants et pour les mélanges. Cependant, avant d'utiliser la présente méthode d'essai pour un mélange dans le but de générer des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si, et dans l'affirmative pourquoi, cette méthode fournit des résultats adéquats pour l'utilisation souhaitée. Cette vérification n'est pas nécessaire lorsque les essais sur les mélanges sont exigés par la réglementation.

Critères d'acceptabilité

29. L'acceptabilité des résultats de l'essai repose sur les critères suivants:

- La densité optique du témoin avec milieu (exposé au milieu de culture) est supérieure ou égale à 0,3 après soustraction de la densité optique du blanc.
- La viabilité du témoin avec solvant est supérieure ou égale à 80 % par rapport à celle du témoin avec milieu. Lorsque plusieurs témoins avec solvant sont utilisés à chaque répétition, chacun de ces témoins devra démontrer une viabilité cellulaire supérieure à 80 % pour qualifier les produits chimiques quand ceux-ci ont été testés avec ces solvants.
- La viabilité cellulaire obtenue avec le témoin positif (0,01 % SLS) est comprise dans un intervalle de deux écarts-types de la moyenne historique. Les limites d'acceptabilité supérieure et inférieure pour le témoin positif sont régulièrement mises à jour, tous les trois mois ou à chaque fois qu'un essai acceptable est mené dans des laboratoires conduisant peu fréquemment (c'est-à-dire moins d'une fois par mois) ce type d'étude. Lorsqu'un laboratoire

n'a pas réalisé un nombre suffisant d'expériences pour établir une distribution de témoins positifs statistiquement robuste, il est acceptable d'utiliser les limites d'acceptabilité supérieure et inférieure établies au moment de la mise au point de la méthode – soit entre 21,1 % et 62,3 % d'après les données expérimentales historiques – et de déterminer la distribution interne au cours des premiers tests de routine.

- d) L'écart-type de la viabilité cellulaire finale pour le produit chimique d'essai, issu de trois répétitions indépendantes, est inférieur à 15 % pour les deux concentrations, 5 % et 0,05 %.

Si l'un de ces critères au moins n'est pas rempli, les résultats sont tenus pour non valides et trois répétitions indépendantes supplémentaires doivent être menées.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

30. Les données de chaque puits (les valeurs de viabilité cellulaire, par exemple) pour chaque répétition, ainsi que la moyenne générale, l'écart-type et la classification doivent être rapportés.

Rapport d'essai

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

Produit chimique d'essai et substances témoins

- Substance mono-constituant: identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChi, formule structurale, et/ou autres identifiants;
- Substance multi-constituants, UVCB et mélange: caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;
- État physique, volatilité, pH, LogP, poids moléculaire, classe chimique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, selon les données disponibles;
- Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc;
- Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Conditions d'application et mode opératoire de la méthode d'essai

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude;
- Description de la méthode d'essai utilisée;
- Lignée cellulaire utilisée et source, nombre de repiquages et degré de confluence des cellules utilisées pour l'essai;
- Détails de la procédure d'essai utilisée;
- Nombre de répétitions et de réplicats utilisés;
- Concentrations de produit chimique d'essai utilisées (si différente des recommandations);
- Justification du choix de solvant pour chaque produit chimique d'essai;
- Durée d'exposition au produit chimique d'essai (si différente des recommandations);
- Description de toutes modifications apportées au mode opératoire;
- Description des critères d'évaluation et de décision appliqués;
- Référence à la moyenne et à l'écart-type historiques du témoin positif;
- Démonstration de la compétence du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (en testant les substances d'épreuve, par exemple) ou démonstration de performances adéquates répétées dans l'application de la méthode d'essai.

Résultats

- Pour chaque produit chimique d'essai et substance témoin, et chaque concentration testée, un tableau présente les valeurs de DO individuelles obtenues pour chaque puits (réplicat), la moyenne arithmétique des valeurs de DO pour chaque répétition indépendante, le pourcentage (%) de viabilité cellulaire pour chaque répétition indépendante, ainsi que la moyenne arithmétique finale du pourcentage (%) de viabilité cellulaire et l'écart-type pour les trois répétitions;
- Résultats pour le témoin avec milieu, le témoin avec solvant et le témoin positif démontrant que les critères d'acceptabilité pour l'étude sont remplis;
- Description des autres effets observés;
- Classification globale obtenue compte tenu du modèle de prédiction / des critères de décision utilisés.

Discussion des résultats

Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ONU. (2013). Système Général Harmonisé de Classification et d'Etiquetage des Produits Chimiques (SGH), Cinquième édition révisée, New York & Genève: Publications des Nations Unies. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponible à l'adresse: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_f.html.
- (2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- (3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.
- (5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.
- (6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.
- (7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Available at: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].
- (8) Chapitre B.5 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux.
- (9) Saito K, *et al.* (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.
- (10) Mikkelsen TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm. Sci.* 1648-1653.
- (11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Brussels, Belgium.

- (12) Gautheron P, *et al.* (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. *Fundam Appl Toxicol.* 18, 442–449.
- (13) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 34). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (14) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N°263). Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

Appendice

DÉFINITIONS

Précision: degré de conformité entre les résultats d'une méthode d'essai et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de la méthode d'essai et l'un de ses aspects de pertinence. Ce terme et le terme «concordance» sont souvent utilisés indifféremment pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (13).

Substance étalon: substance utilisée comme référence dans une comparaison avec un produit chimique d'essai. Une substance étalon doit présenter les propriétés suivantes: (i) provenir d'une ou de plusieurs sources constantes et fiables;; (ii) présenter une similitude structurale et fonctionnelle avec la classe des substances soumises à l'essai;; (iii) posséder des caractéristiques physiques/chimiques connues; (iv) être accompagnée de données confirmant ses effets connus; et (v) avoir une activité connue dans la fourchette des réponses désirées.

Approche «bottom-up»: approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé ne pas nécessiter de classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques ne relevant d'aucune classification (résultat négatif) des autres produits chimiques (résultat positif).

Produit chimique: substance ou mélange.

Irritation oculaire: modification de l'œil provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui est totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec ««Effets réversibles sur l'œil» et avec ««Catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP»».

Taux de faux négatifs: proportion de produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: proportion de produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Danger: propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets néfastes lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population est exposé(e) à cet agent.

Témoin avec milieu: réplikat non traité contenant tous les composants d'un système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons témoins traités ou non avec le produit chimique d'essai afin de déterminer si le solvant interagit avec le système d'essai.

Mélange: mélange ou solution composé de deux substances ou plus.

Substance mono-constituant: Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à une concentration d'au moins 80 % (P/P).

MTT: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de tétrazolium.

Substance multi-constituants: Substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent à une concentration comprise entre 10 % et 80 % (P/P). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

DO: densité optique.

Témoin positif: réplikat contenant tous les composants d'un système d'essai et traité avec une substance induisant notoirement une réponse positive. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

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 (10).

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 en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires ainsi que la répétabilité intra-laboratoire (13).

Sensibilité: proportion des substances positives/actives 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 (10).

Lésion oculaire grave: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec «Effets irréversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP».

Témoin avec solvant/véhicule: échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant ou véhicule utilisé pour tester les échantillons témoins, traités ou non avec le produit chimique d'essai, afin de déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous dans le même solvant ou véhicule. Testé simultanément avec un témoin avec milieu, cet échantillon indique également si le solvant ou véhicule interagit avec le système d'essai.

Spécificité: proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés 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 (13)

Substance: 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.

Tensioactif: Aussi appelé agent de surface; il s'agit d'un produit chimique, tel qu'un détergent, capable de réduire la tension superficielle d'un liquide et de favoriser ainsi sa capacité à mousser ou à pénétrer les solides; il est aussi connu comme agent mouillant.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai«».

Stratégie d'essais à plusieurs niveaux: démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve afin de déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, avant de passer à l'étape suivante. Si le potentiel d'irritation d'un produit chimique d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire. Dans le cas contraire, une procédure expérimentale progressive de type séquentiel sur des animaux est alors lancée jusqu'à ce qu'une classification sans équivoque puisse être effectuée.

Approche «top-down»: approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique d'essai présumé provoquer des lésions oculaires graves, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (résultat positif) des autres produits chimiques (résultat négatif).

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques): système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans le but de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP: voir «Lésions oculaires graves».

Catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP: voir «Irritation oculaire».

Sans catégorie selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP: produit chimique qui n'est pas classé dans la catégorie 1 ou 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP (ou dans la catégorie 2A ou 2B du SGH de l'ONU).

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

B.69 MÉTHODE D'ESSAI SUR MODÈLE D'ÉPITHÉLIUM CORNÉEN HUMAIN RECONSTITUÉ (ECHR) POUR L'IDENTIFICATION DE PRODUITS CHIMIQUES NE NÉCESSITANT AUCUNE CLASSIFICATION NI ÉTIQUETAGE POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSIONS OCULAIRES GRAVES

INTRODUCTION

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 492 (2017) de l'OCDE. Une *lésion oculaire grave* est une lésion des tissus oculaires ou une dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application, selon la définition du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH) des Nations Unies (ONU) (1) et du règlement (CE) n° 1272/2008 de l'Union européenne relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges (ci-après le «règlement CLP»)¹. Toujours selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP, une *irritation oculaire* est définie comme la production de changements dans l'œil suite à l'application d'un produit chimique d'essai sur la surface antérieure de l'œil et qui sont totalement réversibles dans les 21 jours suivant l'application. Les produits chimiques d'essai provoquant des lésions oculaires graves sont classés dans la catégorie 1 du SGH de l'ONU et du règlement CLP, tandis que ceux provoquant une irritation oculaire sont classés dans la catégorie 2 du SGH/du CLP. Les produits chimiques d'essai non classés pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave sont définis comme ne répondant pas aux critères de classification des catégories 1 ou 2 (2A ou 2B) du SGH de l'ONU et du CLP; autrement dit, ils sont considérés comme ne relevant d'aucune catégorie du SGH de l'ONU/du CLP («sans catégorie»).
2. Jusqu'à présent, l'évaluation des lésions oculaires graves/irritations oculaires impliquait généralement le recours à des animaux de laboratoire [méthode d'essai B.5;(2)]. Le choix de la méthode d'essai la plus pertinente et l'utilisation de cette méthode d'essai doivent être envisagés dans le contexte du Document d'orientation de

¹ Règlement (CE) n° 1272/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) n° 1907/2006, JO L 353 du 31.12.2008, p. 1.

l'OCDE sur les Approches Intégrées sur les Essais et l'Évaluation pour les lésions oculaires sévères et l'irritation de l'œil (39).

3. La présente méthode d'essai décrit une procédure *in vitro* permettant l'identification de produits chimiques (substances et mélanges) ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves, conformément au SGH de l'ONU et au règlement CLP. Un modèle d'épithélium cornéen humain reconstitué (EChR) est utilisé, qui reproduit fidèlement les propriétés histologiques, morphologiques, biochimiques et physiologiques de l'épithélium cornéen humain. Quatre autres méthodes d'essai *in vitro* ont été validées, considérées scientifiquement valides et adoptées en tant que méthodes d'essai B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) et B.68 (6), à utiliser pour évaluer le danger de lésions oculaires graves/d'irritation oculaire chez l'humain.
4. Deux essais validés sont inclus dans la présente méthode d'essai. Ils font appel à un modèle tissulaire d'EChR disponible dans le commerce. Le test d'irritation oculaire (TIO) EpiOcular™ et le TIO SkinEthic™ avec épithélium cornéen humain (HCE) ont été validés dans des études d'évaluation de l'irritation oculaire/lésions oculaires graves (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13). Ces deux essais utilisent comme système d'essai un modèle tissulaire d'EChR disponible dans le commerce et sont désignés ci-après en tant que méthodes de référence validées (MRV1 et MRV2, respectivement). D'après les études de validation et l'examen indépendant par des pairs dont ils ont fait l'objet (9)(12), le TIO EpiOcular™ et le TIO HCE SkinEthic™ sont capables d'identifier correctement des produits chimiques (substances et mélanges) ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves selon le SGH de l'ONU, et les essais ont été jugés scientifiquement valides et recommandés pour cet objectif (13).
5. Il est généralement admis que dans notre horizon de prévision, aucun essai unique d'irritation oculaire *in vitro* ne pourra remplacer complètement le test oculaire *in vivo* de Draize (2)(14) pour établir le degré d'irritation oculaire provoqué par les différentes classes de produits chimiques. Cependant, la combinaison de plusieurs méthodes de substitution dans le cadre d'une stratégie d'essais (à plusieurs niveaux) telle que l'approche «bottom-up/top-down» pourrait remplacer le test de Draize (15). L'approche «bottom-up» (15) est conçue pour être appliquée quand, au vu des informations existantes, un produit chimique devrait a priori ne causer aucune irritation oculaire suffisante pour nécessiter une classification, tandis que l'approche «top-down» (15) est indiquée lorsque, d'après les informations existantes, on s'attend à ce qu'un produit chimique provoque des lésions oculaires graves. Le TIO EpiOcular™ et le TIO HCE SkinEthic™ sont recommandés pour identifier sans expérimentation supplémentaire les produits chimiques ne relevant d'aucune

classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP («sans catégorie»), dans le cadre d'une approche «bottom-up/top-down» suggérée par Scott *et al.*, par exemple comme première étape d'une approche «bottom-up» ou comme une des étapes finales dans une approche «top-down» (15). Cependant, le TIO EpiOcular™ et le TIO HCE SkinEthic™ ne sont pas conçus pour permettre de faire la distinction entre les produits chimiques de catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP (lésions oculaires graves) et ceux de catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP (irritation oculaire). Cette distinction doit être faite à une autre étape d'une stratégie par niveaux (15). Un produit chimique identifié comme nécessitant une classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves à l'aide du TIO EpiOcular™ ou du TIO HCE SkinEthic™ devrait être soumis à des essais complémentaires (*in vitro* et/ou *in vivo*) visant à tirer une conclusion définitive («sans catégorie», catégorie 1 ou catégorie 2 selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP), en utilisant les méthodes d'essai B.47, B.48, B.61 ou B.68, par exemple.

6. L'objectif de la présente méthode d'essai est de décrire les procédures utilisées pour évaluer le danger potentiel qu'un produit chimique d'essai présente pour l'œil en se fondant sur sa capacité à provoquer une cytotoxicité sur un modèle tissulaire d'EChR, mesurée avec le test MTT (16) (voir paragraphe 21). La viabilité du tissu d'EChR après exposition à un produit chimique d'essai est déterminée par comparaison avec celle de tissus traités avec la substance servant de témoin négatif (% de viabilité) puis utilisée pour prédire le danger potentiel du produit chimique d'essai pour les yeux.
7. Des normes de performance (17) permettent de simplifier la validation d'essais *in vitro* nouveaux ou modifiés utilisant l'EChR et similaires au TIO EpiOcular™ et au TIO HCE SkinEthic™, conformément aux principes énoncés dans le Document d'orientation n°34 (18), et de modifier rapidement la ligne directrice 492 pour y intégrer lesdits essais. L'acceptation mutuelle des données (AMD) conformément à l'accord de l'OCDE ne sera garantie pour les essais validés selon les normes de performance que si ces essais ont été examinés et incorporés dans la ligne directrice correspondante par l'OCDE.

DÉFINITIONS

8. Les définitions sont données à l'appendice 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

9. La présente méthode d'essai se base sur un modèle tissulaire tridimensionnel d'EChR disponible dans le commerce et produit à partir de kératinocytes primaires de l'épiderme humain (le modèle EpiOcular™ OCL-200), ou à partir de cellules épithéliales cornéennes humaines immortalisées (le TIO HCE/S SkinEthic™). Les modèles tissulaires d'EChR EpiOcular™ OCL-200 et HCE/S SkinEthic™ sont fidèles à la structure tridimensionnelle de l'épithélium cornéen *in vivo* et produits à partir de cellules de l'espèce cible (19)(20). En outre, ces essais mesurent directement la cytotoxicité due à la pénétration transcornéenne du produit chimique et la production de lésions cellulaires et tissulaires après exposition de l'œil à un produit chimique, ce qui permet d'évaluer la réponse globale d'irritation oculaire/de lésion oculaire grave *in vivo*. Les lésions cellulaires peuvent être causées par plusieurs mécanismes d'action (voir paragraphe 20), mais la cytotoxicité joue un rôle mécanique majeur, sinon le rôle principal, dans l'ampleur de la réponse globale de lésion oculaire grave/d'irritation oculaire après exposition à un produit chimique, réponse qui se manifeste *in vivo* principalement par l'opacité cornéenne, l'iritite, la rougeur et/ou le chémosis conjonctivaux, quels que soient les processus physico-chimiques sous-jacents des lésions tissulaires.
10. Un large éventail de produits chimiques, représentant de nombreux types et classes chimiques, poids moléculaires, LogP, structures chimiques, etc., a été testé dans l'étude de validation sur laquelle s'appuie la présente méthode d'essai. La base de données de validation du TIO EpiOcular™ comprenait un total de 113 produits chimiques, couvrant 95 groupes fonctionnels organiques différents d'après une analyse de l'OCDE effectuée à l'aide de la boîte à outils QSAR (8). La majorité de ces produits chimiques étaient des substances mono-constituant, mais plusieurs substances multi-constituants étaient aussi incluses dans l'étude (dont 3 homopolymères, 5 copolymères et 10 quasi-polymères). Concernant les états physiques et les catégories selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP, les 113 produits chimiques d'essai étaient répartis comme suit: 13 liquides de catégorie 1, 15 solides de catégorie 1, 6 liquides de catégorie 2A, 10 solides de catégorie 2A, 7 liquides de catégorie 2B, 7 solides de catégorie 2B, 27 liquides sans catégorie et 28 solides sans catégorie (8). La base de données de validation du TIO HCE SkinEthic™ comprenait un total de 200 produits chimiques, couvrant 165 groupes fonctionnels organiques différents d'après une analyse de l'OCDE effectuée à l'aide de la boîte à outils QSAR (8)(10)(11). La majorité de ces produits chimiques étaient des substances mono-constituant, mais plusieurs substances multi-constituants étaient aussi incluses dans l'étude (dont 10 polymères). Concernant les états physiques et les catégories selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP, les 200 produits chimiques d'essai étaient répartis comme suit: 27 liquides de catégorie 1, 24 solides de

catégorie 1, 19 liquides de catégorie 2A, 10 solides de catégorie 2A, 9 liquides de catégorie 2B, 8 solides de catégorie 2B, 50 liquides sans catégorie et 53 solides sans catégorie (10)(11).

11. La présente méthode d'essai peut être utilisée pour tester des produits chimiques (substances et mélanges) solides, liquides, semi-solides et sous forme de cires. Les liquides peuvent être aqueux ou non; les solides peuvent être solubles ou insolubles dans l'eau. Si possible, les solides sont moulus finement avant application; aucun autre prétraitement de l'échantillon n'est nécessaire. Les gaz et aérosols n'ont pas fait l'objet d'une étude de validation. Bien qu'il soit envisageable de pouvoir tester des gaz et des aérosols en faisant appel à l'EChR, l'actuelle méthode d'essai ne permet pas de tester les produits de ce type.
12. Les produits chimiques d'essai qui absorbent la lumière à la même longueur d'onde que le formazan bleu (naturellement ou après traitement) et les produits chimiques d'essai pouvant directement réduire le colorant vital MTT (en formazan) peuvent interférer avec les mesures de la viabilité tissulaire et nécessitent l'utilisation de témoins adaptés pour corriger l'essai en fonction de ces interférences. Le type de témoins adaptés nécessaire dépendra du type d'interférence que présente le produit chimique d'essai et de la procédure employée pour mesurer quantitativement le formazan (voir paragraphes 36-42).
13. Les résultats issus des études de pré-validation (21)(22) et de validation complète (8)(10)(11) ont démontré que le TIO EpiOcular™ et le TIO HCE SkinEthic™ peuvent être menés par des laboratoires n'ayant jamais réalisé cet essai auparavant et qu'ils sont reproductibles au sein des laboratoires et entre laboratoires. D'après ces études, sur la base des données relatives à 113 produits chimiques, le taux de reproductibilité attendu pour le TIO EpiOcular™ en matière de concordance des prédictions est de l'ordre de 95 % au sein des laboratoires et de 93 % entre laboratoires. Sur la base de données relatives à 120 produits chimiques, le taux de reproductibilité attendu pour le TIO HCE SkinEthic™ en matière de concordance des prédictions est de l'ordre de 92 % au sein des laboratoires et de 95 % entre laboratoires.
14. Le TIO EpiOcular™ peut être employé pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves au titre du SGH de l'ONU et du règlement CLP. D'après les données obtenues dans l'étude de validation (8), le TIO EpiOcular™ présente une précision globale de 80 % (sur 112 produits chimiques), une sensibilité de 96 % (sur 57 produits chimiques), un taux de faux négatifs de 4 % (sur 57 produits chimiques), une

spécificité de 63 % (sur 55 produits chimiques) et un taux de faux positifs de 37 % (sur 55 produits chimiques) par comparaison avec les données de référence obtenues avec le test *in vivo* sur œil de lapin (méthode d'essai B.5) (2)(14) et classées selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP. Dans une étude testant 97 formulations liquides de produits agrochimiques, une performance similaire à celle démontrée dans l'étude de validation a été obtenue avec la méthode du TIO EpiOcular™ pour ce type de mélanges (23). Les 97 formulations étaient réparties comme suit: 21 en catégorie 1, 19 en catégorie 2A, 14 en catégorie 2B et 43 sans catégorie, selon le SGH de l'ONU (1) et sur la base des données de référence obtenues avec le test *in vivo* sur œil de lapin (méthode d'essai B.5) (2)(14). Une précision globale de 82 % (sur 97 formulations), une sensibilité de 91 % (sur 54 formulations), un taux de faux négatifs de 9 % (sur 54 formulations), une spécificité de 72 % (sur 43 formulations) et un taux de faux positifs de 28 % (sur 43 formulations) ont été obtenus (23).

15. Le TIO HCE SkinEthic™ peut être employé pour identifier les produits chimiques ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves au titre du SGH de l'ONU et du règlement CLP. D'après les données obtenues dans l'étude de validation (10)(11), le TIO HCE SkinEthic™ présente une précision globale de 84 % (sur 200 produits chimiques), une sensibilité de 95 % (sur 97 produits chimiques), un taux de faux négatifs de 5 % (sur 97 produits chimiques), une spécificité de 72 % (sur 103 produits chimiques) et un taux de faux positifs de 28 % (sur 103 produits chimiques) par comparaison avec les données de référence obtenues avec le test *in vivo* sur œil de lapin (méthode d'essai B.5) (2)(14) et classées selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP.
16. Les taux de faux négatifs obtenus avec les deux essais sur EChR sont conformes à la probabilité globale qu'au moins 12 % des produits chimiques identifiés comme relevant de la catégorie 2 du SGH de l'ONU et du règlement CLP avec le test de Draize *in vivo* soient également classés «sans catégorie» selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP lors de la répétition d'un essai, en raison de la variabilité inhérente de la méthode au cours de l'essai (24). Les taux de faux positifs obtenus avec les deux méthodes d'essai sur EChR pour les substances et les mélanges ne sont pas préoccupants dans le contexte de la présente méthode d'essai, étant donné que tous les produits chimiques d'essai provoquant une viabilité tissulaire inférieure ou égale aux seuils définis (voir paragraphe 44) feront ensuite l'objet d'autres essais *in vitro* selon d'autres méthodes, ou en dernier recours d'essais chez le lapin, en fonction des exigences de la réglementation, selon une démarche expérimentale séquentielle fondée sur l'analyse du poids de la preuve. Ces méthodes d'essai peuvent être utilisées pour tous les types de produits chimiques, un résultat négatif pouvant être

accepté pour ne pas classer un produit chimique pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves («sans catégorie» selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP). Il y a lieu de consulter les autorités réglementaires compétentes avant de mettre en œuvre le TIO EpiOcular™ ou le TIO HCE SkinEthic™ dans un système de classification autre que le SGH de l'ONU/le règlement CLP.

17. Une limite de cette méthode d'essai est qu'elle ne permet pas de distinguer les produits chimiques produisant une irritation oculaire ou des effets réversibles sur l'œil (catégorie 2) de ceux entraînant des lésions oculaires graves ou des effets irréversibles sur l'œil (catégorie 1 du SGH de l'ONU et du CLP), ni les produits irritants pour l'œil (catégorie optionnelle 2A) de ceux modérément irritants pour l'œil (catégorie optionnelle 2B), tels que définis dans le SGH de l'ONU (1). Pour établir cette distinction, des essais supplémentaires avec d'autres méthodes d'essai *in vitro* sont nécessaires.
18. Dans la présente méthode d'essai, le terme «produit chimique d'essai» désigne ce qui est soumis à l'essai¹ et ne fait pas référence à l'applicabilité de la méthode EChR pour les essais sur des substances et/ou mélanges.

PRINCIPE DE L'ESSAI

19. Le produit chimique d'essai est appliqué localement sur au moins deux modèles tridimensionnels d'EChR et la viabilité tissulaire est mesurée après l'exposition et une période d'incubation post-traitement. Les tissus d'épithélium cornéen humain sont reconstitués à partir de kératinocytes épidermiques humains primaires, ou à partir de cellules épithéliales cornéennes humaines immortalisées, cultivés pendant plusieurs jours jusqu'à la formation d'un épithélium stratifié, hautement différencié et morphologiquement semblable à l'épithélium cornéen humain. Le modèle tissulaire d'EChR EpiOcular™ est constitué d'au moins trois couches cellulaires viables et d'une surface non kératinisée présentant une structure similaire à celle de la cornée *in vivo*. Le modèle tissulaire d'EChR HCE SkinEthic™ est constitué d'au moins quatre couches cellulaires viables comprenant des cellules basales colonnaires, des cellules

¹ En juin 2013, la Réunion conjointe est convenue que, dans la mesure du possible, le terme «produit chimique d'essai» devrait désormais être employé de façon plus cohérente pour désigner ce qui est soumis à l'essai dans les futures lignes directrices nouvelles ou révisées de l'OCDE.

amplificatrices transitoires et des cellules superficielles squameuses et présentant une structure similaire à celle de l'épithélium cornéen humain normal (20)(26).

20. Les lésions oculaires graves ou l'irritation oculaire consécutives à l'application d'un produit chimique, qui se manifestent *in vivo* principalement par l'opacité cornéenne, l'iritite et la rougeur et/ou le chémosis conjonctivaux, résultent d'une cascade d'événements débutant par la pénétration du produit chimique à travers la cornée et/ou la conjonctive et la production de lésions cellulaires. Plusieurs mécanismes d'action peuvent provoquer des lésions cellulaires, parmi lesquels: la lyse de la membrane cellulaire (par des tensioactifs ou des solvants organiques, par exemple); la coagulation de macromolécules, notamment les protéines (par des tensioactifs, des solvants organiques, des alcalis et des acides, par exemple); la saponification des lipides (par des alcalis, par exemple); et l'alkylation ou d'autres interactions covalentes avec des macromolécules (par des agents de blanchiment, des peroxydes et des agents alkylants, par exemple) (15)(27)(28). Cependant, il a été démontré que la cytotoxicité joue un rôle mécanique important, sinon le rôle principal, dans l'ampleur de la réponse globale d'irritation oculaire/de lésion oculaire grave après exposition à un produit chimique, quels que soient les processus physico-chimiques sous-jacents des lésions tissulaires (29)(30). En outre, le pouvoir de lésion oculaire grave/d'irritation oculaire d'un produit chimique est déterminé principalement par l'ampleur de la lésion initiale (31), laquelle est corrélée avec l'étendue de la mort cellulaire (29) et à l'ampleur des effets et conséquences éventuelles qui en découlent (32). Par conséquent, les produits faiblement irritants n'ont en général d'effet que sur l'épithélium superficiel de la cornée, les produits modérément irritants affectent principalement l'épithélium et le stroma superficiel, et les produits gravement irritants provoquent des lésions de l'épithélium, du stroma profond et parfois de l'endothélium cornéen (30)(33). On mesure la viabilité du tissu d'EChR après exposition locale à un produit chimique d'essai afin de distinguer les produits chimiques ne nécessitant pas d'être classés pour les lésions oculaires graves/l'irritation oculaire («sans catégorie» selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP) de ceux nécessitant d'être classés et étiquetés (catégories 1 et 2 selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP) en partant du principe que tous les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves ou une irritation oculaire présentent un caractère cytotoxique pour l'épithélium cornéen et/ou la conjonctive.
21. La viabilité tissulaire de l'EChR est mesurée via la conversion enzymatique du colorant vital MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium, bromure de tétrazolium; numéro CAS 298-93-1] par les cellules viables du tissu en un sel de formazan bleu mesuré quantitativement après son extraction des tissus (16). Les

produits chimiques qui ne relèvent d'aucune classification dans le SGH de l'ONU et le règlement CLP («sans catégorie») sont ceux qui ne provoquent pas une diminution de la viabilité tissulaire en deçà d'un seuil défini (à savoir, viabilité tissulaire > 60 % avec le TIO EpiOcular™ et le TIOL¹ HCE SkinEthic™, ou > 50 % avec le TIOS² HCE SkinEthic™)(voir paragraphe 44).

DEMONSTRATION DES COMPÉTENCES

22. Avant d'appliquer en routine les essais sur EChR à des fins réglementaires, les laboratoires doivent démontrer leurs compétences techniques en classant correctement les quinze produits chimiques d'épreuve recommandés au tableau 1. Ces produits chimiques ont été sélectionnés parmi ceux utilisés lors de l'étude de validation des MRV (8)(10)(11). La sélection comprend, autant que possible, des produits chimiques qui: (i) couvrent plusieurs états physiques; (ii) couvrent la gamme complète des effets *in vivo* de lésion oculaire grave/d'irritation oculaire d'après les données de haute qualité obtenues avec le test de référence *in vivo* sur œil de lapin (méthode d'essai B.5) (2)(14) et selon le système de classification du SGH de l'ONU (catégories 1, 2A, 2B ou «sans catégorie») (1) et le système de classification du règlement CLP (catégories 1, 2 ou «sans catégorie»); (iii) couvrent les différents critères de classification *in vivo* (24)(25); (iv) sont représentatifs des classes chimiques utilisées dans l'étude de validation (8)(10)(11); (v) couvrent un large spectre de groupes fonctionnels organiques (8)(10)(11); (vi) ont une structure chimique bien définie (8)(10)(11); (vii) sont colorés et/ou sont des réducteurs directs du MTT; (viii) ont donné des résultats reproductibles lors de la validation des méthodes d'essai sur EChR; (ix) ont été classés correctement lors de la validation des méthodes d'essai sur EChR; (x) couvrent la gamme complète des réponses *in vitro* d'après des données de haute qualité issues des méthodes d'essai sur EChR (viabilité 0-100 %); (xi) sont disponibles dans le commerce; et (xii) ne sont pas excessivement coûteux à acquérir et/ou éliminer. Lorsque l'un des produits chimiques du tableau n'est pas disponible ou

¹ TIOL: TIO pour les liquides dans le cas du HCE SkinEthic™

² TIOS: TIO pour les solides dans le cas du HCE SkinEthic™

lorsque sa non-utilisation est justifiable, un autre produit chimique remplissant les conditions énoncées ci-avant peut être utilisé, par exemple un des produits chimiques utilisés pour la validation de la MRV. Ces changements doivent cependant être justifiés.

Tableau 1: Liste des produits chimiques d'épreuve de compétence

Nom chimique	N° CAS	Groupe fonctionnel organique ¹	État physique	Viabilité MRV1 (%) ²	Viabilité MRV2 (%) ³	Prédiction MRV	Réducteur du MTT	Interférence couleur
<i>In Vivo</i> Catégorie 1⁴								
Méthylthioglycolate	2365-48-2	Ester d'acide carboxylique; thioalcoolol	L	10,9±6,4	5,5±7,4	Aucune prédiction possible	O (fort)	N
Acrylate d'hydroxyétyl	818-61-1	Acrylate; alcool	L	7,5±4,7 ⁵	1,6±1,0	Aucune prédiction possible	N	N
2,5-Diméthyl-2,5-hexanédiol	110-03-2	Acrylate; alcool	S	2,3±0,2	0,2±0,1	Aucune prédiction possible	N	N
Oxalate de sodium	62-76-0	Acide oxocarboxylique	S	29,0±1,2	5,3±4,1	Aucune prédiction possible	N	N
<i>In Vivo</i> Catégorie 2A⁴								
acide D-gluconique, composé avec N,N"-bis(4-chlorophényl)-3,12-diimino-2,4,11,13-tétraazatétradécanediamidine (2:1) (20 %, aqueux) ⁶	18472-51-0	Halogénure aromatique hétérocyclique; halogénure d'aryle; groupe dihydroxyle; guanidine	L	4,0±1,1	1,3±0,6	Aucune prédiction possible	N	O (faible)
Benzoate de sodium	532-32-1	Aryle; acide carboxylique	S	3,5±2,6	0,6±0,1	Aucune prédiction possible	N	N
<i>In Vivo</i> Catégorie 2B⁴								
Diéthyl-toluamide	134-62-3	Benzamide	L	15,6±6,3	2,8±0,9	Aucune prédiction possible	N	N
2,2-Diméthyl-3-méthylènebicyclo [2.2.1] heptane	79-92-5	Alcane, ramifié avec carbone tertiaire; alcène; bicycloheptane; composés carbocycliques pontés; cycloalcane	S	4,7±1,5	15,8±1,1	Aucune prédiction possible	N	N
<i>In Vivo</i> Sans Catégorie⁴								
1-Éthyl-3-méthylimidazolium éthylsulfate	342573-75-5	Alcoyle; sel d'ammonium; aryle; imidazole; sulfate	L	79,9±6,4	79,4±6,2	Sans Cat	N	N

Nom chimique	N° CAS	Groupe fonctionnel organique ¹	État physique	Viabilité MRV1 (%) ²	Viabilité MRV2 (%) ³	Prédiction MRV	Réducteur du MTT	Interférence couleur
Éther dicaprylyle	629-82-3	alcoyle; éther	L	97,8±4,3	95,2±3,0	Sans Cat	N	N
Butoxyde de pipéronyle	51-03-6	Alcoyle; benzodioxole; benzyle; éther	L	104,2±4,2	96,5±3,5	Sans Cat	N	N
Polyéthylène glycol (PEG-40) Huile de ricin hydrogénée	61788-85-0	Acylal; alcool; allyle; éther	Visqueux	77,6±5,4	89,1±2,9	Sans Cat	N	N
1-(4-Chlorophényl)-3-(3,4-dichlorophényl) urée Triclocarban	101-20-2	Halogénure aromatique hétérocyclique; halogénure d'aryle; dérivés de l'urée	S	106,7±5,3	101,9±6,6	Sans Cat	N	N
2,2'-méthylènebis(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol)	103597-45-1	Alcane ramifié avec carbone quaternaire; composé aromatique polycyclique; hétérocycles saturés polycycliques; précurseur de quinone; tert-butyle	S	102,7±13,4	97,7±5,6	Sans Cat	N	N
Tétrafluoroborate de potassium	14075-53-7	Sels inorganiques	S	88,6±3,3	92,9±5,1	Sans Cat	N	N

Abréviations: N° CAS = Numéro d'enregistrement dans le *Chemical Abstracts Service*; SGH de l'ONU = Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies (1); MRV1 = Méthode de référence validée, à savoir le TIO EpiOcular™; MRV2 = Méthode de référence validée, à savoir le TIO HCE SkinEthic™; Interférence couleur = interférence de couleurs avec la mesure de l'absorbance (densité optique, DO) du formazan.

¹Groupes fonctionnels organiques déterminés d'après une analyse emboîtée de l'OCDE avec la Boîte à outils (3.1) (8).

²Sur la base des résultats obtenus avec le TIO EpiOcular™ dans l'étude de validation des méthodes d'évaluation de l'irritation oculaire de l'EURL ECVAM/Cosmetics Europe (8).

³ Sur la base des résultats obtenus avec le TIO HCE SkinEthic™ dans l'étude de validation (10)(11).

⁴Sur la base des résultats obtenus avec le test *in vivo* sur œil de lapin (méthode d'essai B.5/ligne directrice 405 de l'OCDE) (2)(14) et le SGH de l'ONU.

⁵Sur la base des résultats obtenus avec l'étude suivant la stratégie du Consortium CEFIC pour les tests d'irritation oculaire *in vitro* (CON4EI).

⁶Classification dans les catégories 2A ou 2B dépend de l'interprétation des critères du SGH de l'ONU pour distinguer ces deux catégories, à savoir que l'on doit constater des effets chez 1 animal sur 3 ou 2 animaux sur 3 le septième jour pour classer le produit dans la catégorie 2A. L'étude *in vivo* a été menée sur 3 animaux. Tous les effets, sauf l'opacité de la cornée chez un animal, avaient disparu le septième jour ou avant. L'animal dont les effets n'avaient pas disparu le septième jour présentait un score d'opacité cornéenne de 1 le septième jour, et l'effet avait disparu au neuvième jour.

23. Dans le cadre de la démonstration des compétences, il est recommandé aux utilisateurs de contrôler les propriétés de barrière des tissus dès réception, comme précisé par le producteur du modèle d'EChR (voir paragraphes 25, 27 et 30). Cette étape est particulièrement importante lorsque les tissus sont transportés sur de longues distances/durées. Lorsqu'un essai a été réalisé avec succès et que le laboratoire en maîtrise l'utilisation et a démontré cette maîtrise, il n'est plus nécessaire de procéder systématiquement à cette vérification. Toutefois, pour les essais utilisés en routine, il est recommandé de continuer à évaluer les propriétés de barrière à intervalles réguliers.

PROCÉDURE

24. Les essais actuellement couverts par la présente méthode d'essai sont les tests scientifiquement valides TIO EpiOcular™ et TIO HCE SkinEthic™ (9)(12)(13), désignés en tant que Méthodes de référence validées (MRV1 et MRV2, respectivement). Les modes opératoires de référence pour les méthodes EChR sont disponibles et doivent être suivis lors de la mise en œuvre et de l'emploi des méthodes d'essai en laboratoire (34)(35). Les paragraphes qui suivent et l'appendice 2 décrivent les principaux éléments et procédures des essais sur EChR.

ÉLÉMENTS DES MÉTHODES D'ESSAI EChR

Conditions générales

25. Des cellules dérivées de cellules humaines pertinentes sont utilisées pour reconstituer un modèle tridimensionnel de tissu épithélial cornéen, qui doit être composé de cellules progressivement stratifiées mais non cornifiées. Le modèle d'EChR est préparé dans des plaques de culture avec une membrane synthétique poreuse au travers de laquelle les nutriments peuvent atteindre les cellules. Le modèle d'épithélium cornéen reconstitué comporte plusieurs couches viables de cellules épithéliales non kératinisées. Le modèle d'EChR présente une surface épithéliale en contact direct avec l'air, de façon à permettre une application locale directe des produits chimiques d'essai similaire à une exposition *in vivo* de l'épithélium cornéen aux produits chimiques. Le modèle d'EChR forme une barrière fonctionnelle suffisamment robuste pour résister à la pénétration rapide des substances cytotoxiques étalons telles que le Triton X-100 ou le dodécylsulfate de sodium (SDS). La fonction de barrière devra être démontrée et peut être évaluée en déterminant soit la durée d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité tissulaire de 50 % (TE₅₀) après application de la substance étalon à une concentration fixe déterminée (100 µl de Triton X-100 à 0,3 % (v/v), par exemple), soit la concentration nécessaire pour réduire la viabilité tissulaire de 50 % (CI₅₀) après application de la substance étalon

pendant une durée d'exposition fixée (30 minutes de traitement avec 50 µl de SDS, par exemple) (voir paragraphe 30). Le modèle d'EChR présente des propriétés de confinement suffisantes pour éviter que le produit chimique d'essai puisse contourner le tissu viable, ce qui nuirait à la qualité de la modélisation de l'exposition de la cornée. Les cellules d'origine humaine utilisées dans le modèle d'EChR sont exemptes de toute contamination bactérienne, virale, mycoplasmaïque ou mycosique. Le fournisseur vérifie la stérilité du modèle tissulaire et l'absence de contamination mycosique ou bactérienne.

Conditions fonctionnelles

Viabilité

26. La viabilité est mesurée au moyen du test MTT (16). Dans les cellules viables du modèle d'EChR, le colorant vital MTT est réduit en un précipité bleu de formazan, qui est ensuite extrait du tissu avec de l'isopropanol (ou un solvant semblable). Le formazan extrait peut être quantifié soit en mesurant l'absorbance (densité optique, DO), soit suivant une procédure d'analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie (36). La DO du solvant d'extraction seul doit être suffisamment faible, c'est-à-dire $< 0,1$. Les utilisateurs du modèle d'EChR s'assurent que chaque lot de tissu EChR remplit les critères définis pour le témoin négatif. Les plages d'acceptabilité pour la DO du témoin négatif pour les MRV sont précisées au tableau 2. Les utilisateurs de la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie utilisent la plage de DO du témoin négatif fournie au tableau 2 comme critère d'acceptabilité pour le témoin négatif. Il doit être prouvé que les tissus traités avec le témoin négatif sont stables en culture (c'est-à-dire qu'ils présentent des mesures de viabilité comparables) tout au long de la période d'exposition. Le producteur du tissu suit une procédure semblable dans le cadre du contrôle qualité des lots de tissu, mais dans ce cas les critères d'acceptabilité applicables sont différents de ceux spécifiés au tableau 2. Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour les valeurs de DO du témoin négatif (dans les conditions de la méthode d'essai du contrôle qualité) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'EChR.

Tableau 2: Plages d'acceptabilité pour la DO du témoin négatif (pour les utilisateurs de l'essai)

Essai	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
TIO EpiOcular™ (OCL-200) – MRV1 (protocoles pour les liquides et les solides)	$> 0,8^1$	$< 2,5$
TIO HCE SkinEthic™ (HCE/S) – MRV2	$> 1,0$	$\leq 2,5$

(protocoles pour les liquides et les solides)		

¹ Cette plage d'acceptabilité prend en compte la possibilité d'allonger la durée de transport/stockage (> 4 jours, par exemple), dont il a été démontré qu'elle n'a pas d'incidence sur le bon déroulement de la méthode d'essai (37).

Fonction de barrière

27. Le modèle d'EChR doit être suffisamment épais et résistant pour résister à la pénétration rapide de substances cytotoxiques étalons. Cette capacité est évaluée par la valeur TE₅₀ (Triton X-100) ou par la CI₅₀ (SDS), par exemple (tableau 3). La fonction de barrière de chaque lot de modèle d'EChR est démontrée par le développeur/fournisseur lors de la fourniture des tissus à l'utilisateur final (voir paragraphe 30).

Morphologie

28. L'examen histologique du modèle d'EChR doit mettre en évidence une structure semblable à celle de l'épithélium cornéen humain (comprenant au moins 3 couches de cellules épithéliales viables et une surface non kératinisée). Pour les MRV, une morphologie adéquate a été démontrée par le développeur/fournisseur et il n'est donc pas nécessaire de la démontrer à nouveau chaque fois qu'un utilisateur fait usage d'un lot.

Reproductibilité

29. La reproductibilité dans le temps des résultats obtenus à l'aide des témoins positifs et négatifs doit être démontrée.

Contrôle de qualité

30. Il est impératif que le développeur/fournisseur du modèle d'EChR garantisse et démontre que chaque lot utilisé répond à des critères de fabrication définis, dont les plus pertinents sont ceux relatifs à la viabilité (paragraphe 26) et à la fonction de barrière (paragraphe 27). Une plage d'acceptabilité (valeurs limites inférieure et supérieure) pour la fonction de barrière telle que mesurée avec le TE₅₀ ou la CI₅₀ (voir paragraphes 25 et 26) est établie par le développeur/fournisseur du modèle d'EChR. La plage d'acceptabilité pour les valeurs TE₅₀ et CI₅₀ retenues par le développeur/fournisseur des lots de tissu d'EChR (utilisés dans les MRV) lors du contrôle de qualité, est donnée au tableau 3. Le développeur/fournisseur des tissus d'EChR doit fournir les données démontrant le respect de tous les critères de fabrication aux utilisateurs de la méthode d'essai, afin qu'ils puissent présenter ces informations dans le rapport d'essai. Seuls les résultats obtenus avec des tissus remplissant tous les critères de fabrication définis peuvent être considérés comme des prédictions fiables pour les produits chimiques ne relevant d'aucune classification

pour l'irritation oculaire ou les lésions oculaires graves selon le SGH de l'ONU/le règlement CLP.

Tableau 3: Critères de contrôle de qualité des lots

Essai	Valeur limite inférieure d'acceptation	Valeur limite supérieure d'acceptation
TIO EpiOcular™ (OCL-200) - MRV1 (100 µl de Triton X-100 à 0,3 % (v/v))	ET ₅₀ = 12,2 min	ET ₅₀ = 37,5 min
TIO HCE SkinEthic™ (HCE/S) – MRV2 (traitement de 30 min avec 50 µl de SDS)	IC ₅₀ = 1 mg/ml	IC ₅₀ = 3,2 mg/ml

Application des produits chimiques d'essai et témoins

31. Il convient d'utiliser au minimum deux réplicats de tissus par produit chimique d'essai et par substance témoin dans chaque épreuve. Deux protocoles de traitement différents sont employés pour les produits chimiques d'essai liquides et pour les produits chimiques d'essai solides (34)(35). Dans les deux méthodes et les deux protocoles, avant d'être exposée à un produit chimique d'essai, la surface des modèles tissulaires est pré-traitée avec du tampon phosphate salin de Dulbecco sans calcium et sans magnésium (DPBS sans Ca²⁺/Mg²⁺), pour reproduire le plus fidèlement possible les conditions d'humidité de l'œil humain. Les tissus sont traités avec le(s) produit(s) chimique(s) testé(s) ou avec les substances témoin. Dans les deux protocoles des deux MRV, il convient d'appliquer une quantité suffisante de produit chimique d'essai ou de substance témoin pour recouvrir uniformément la surface épithéliale sans pour autant utiliser une dose infinie (voir paragraphes 32 et 33) (appendice 2).
32. Les produits chimiques d'essai pouvant être appliqués à la pipette à 37°C ou à des températures plus basses (au besoin, avec une pipette à piston) sont considérés comme des liquides dans les MRV. Dans le cas contraire, ils sont considérés comme des solides (voir paragraphe 33). Dans les MRV, le produit chimique d'essai liquide est appliqué uniformément sur la surface de tissu (soit une application d'au moins 60 µl/cm²) (voir appendice 2 (33)(34)). Il convient d'éviter autant que possible les effets de capillarité (effets de tension de surface) pouvant être observés en raison des faibles volumes appliqués sur les inserts (surface de tissu), ce afin de garantir un bon dosage sur le tissu. Les tissus traités avec les produits chimiques d'essai liquides sont incubés pendant 30 minutes dans les conditions de culture normalisées (37±2°C, sous CO₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %). À la fin de la période d'exposition, les produits chimiques d'essai et les substances témoin sont soigneusement éliminés de la surface de tissu par

un rinçage abondant au DPBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ à température ambiante. Cette étape de rinçage est suivie par une immersion post-traitement dans un milieu de culture frais à température ambiante (afin d'éliminer tout produit chimique d'essai absorbé par le tissu) pendant une durée prédéfinie qui varie en fonction de la MRV utilisée. Pour la MRV1 seulement, une incubation post-traitement est réalisée dans un milieu de culture frais dans les conditions de culture normalisées, avant d'effectuer le test MTT (voir appendice 2 (34)(35)).

33. Les produits chimiques d'essai ne pouvant pas être appliqués à la pipette à 37°C ou à des températures plus basses sont considérés comme des solides dans les MRV. La quantité appliquée doit être suffisante pour recouvrir complètement la surface de tissu, à savoir une application d'au moins 60 mg/cm² (appendice 2). Chaque fois que possible, il convient de tester les solides sous la forme d'une poudre fine. Les tissus traités avec les produits chimiques d'essai solides sont incubés pendant une durée prédéfinie (en fonction de la VRM utilisée) dans les conditions de culture normalisées (voir appendice 2 (34)(35)). À la fin de la période d'exposition, les produits chimiques d'essai et les substances témoin sont soigneusement éliminés de la surface de tissu par un rinçage abondant au DPBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ à température ambiante. Cette étape de rinçage est suivie par une immersion post-traitement pendant une durée prédéfinie (qui varie en fonction de la VRM utilisée) dans un milieu de culture frais à température ambiante (afin d'éliminer tout produit chimique d'essai absorbé par le tissu) puis par une incubation post-traitement dans un milieu frais dans les conditions de culture normalisées, avant d'effectuer le test MTT (voir appendice 2, (34)(35)).
34. Des témoins négatifs et positifs sont utilisés simultanément dans chaque épreuve, afin de démontrer que la viabilité (dans le cas du témoin négatif) et la sensibilité (dans le cas du témoin positif) des tissus se situent dans une fourchette historique définie de valeurs acceptables. Le témoin négatif permet aussi de fixer la valeur de départ (viabilité à 100 %) à partir de laquelle est calculée la viabilité relative (en pourcentage) des tissus traités avec les produits chimiques d'essai (%viabilité_{test}). La substance recommandée pour le témoin positif dans les MRV est l'acétate de méthyle pur (N°CAS 79-20-9;; Sigma-Aldrich, Cat# 45997;; liquide). Les substances recommandées pour le témoin négatif dans la MRV1 et la MRV2 sont l'eau (H₂O) extra-pure et le DPBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, respectivement. Ces substances sont celles employées comme témoins dans les études de pré-validation et de validation des MRV, et celles pour lesquelles il existe le plus de données historiques. L'utilisation d'autres substances adéquates pour les témoins positifs et négatifs doit être dûment justifiée scientifiquement. Les témoins négatif et positif sont testés suivant les mêmes protocoles que ceux utilisés pour les produits chimiques d'essai dans l'épreuve

(liquides et solides). Cette application est suivie d'une exposition au traitement, d'un rinçage, d'une immersion post-traitement et d'une incubation post-traitement le cas échéant, tel que décrit pour les témoins utilisés simultanément avec les produits chimiques liquides (voir paragraphe 32) ou pour les témoins utilisés simultanément avec les produits chimiques solides (voir paragraphe 33), avant d'effectuer le test MTT (voir paragraphe 35) (34)(35). Un seul témoin positif et un seul témoin négatif par épreuve suffisent pour tous les produits chimiques d'essai présentant le même état physique (liquide ou solide).

Mesure de la viabilité tissulaire

35. Le test MTT est une méthode quantitative normalisée (16) qu'il convient d'utiliser pour quantifier la viabilité des tissus dans la présente méthode d'essai. Elle est compatible avec une utilisation sur un modèle tissulaire tridimensionnel. Le test MTT est réalisé immédiatement après la période d'incubation post-traitement. Selon les MRV, l'échantillon de modèle d'EChR est immergé dans 0,3 ml de solution MTT à 1 mg/ml pendant 180 ± 15 minutes dans les conditions de culture normalisées. Dans les cellules viables du modèle d'EChR, le colorant vital MTT est réduit en un précipité bleu de formazan. Le précipité bleu de formazan est ensuite extrait à l'aide d'un volume adéquat d'isopropanol (ou d'un solvant similaire)(34)(35). Pour les tissus exposés à des produits chimiques d'essai liquides, l'extraction est faite à partir des couches supérieure et inférieure des tissus, tandis que, pour les tissus exposés à des produits chimiques d'essai solides ou à des liquides colorés, l'extraction est faite à partir de la seule couche inférieure du tissu (afin de réduire au minimum tout risque de contamination de la solution d'isopropanol d'extraction avec un résidu de produit chimique d'essai présent dans les tissus). Pour les tissus exposés à des produits chimiques d'essai difficiles à rincer, l'extraction peut aussi être faite à partir de la seule couche inférieure du tissu. Les substances témoin positives et négatives testées en parallèle sont traitées de la même manière que les produits chimiques d'essai. Le formazan extrait est quantifié soit par mesure de l'absorbance (DO) à 570 nm et avec un filtre passe-bande d'une largeur maximale de ± 30 nm, soit par CLHP/CLUP-spectrophotométrie (voir paragraphe 42) (11)(36).
36. Les propriétés optiques du produit chimique d'essai ou son action chimique sur le MTT sont susceptibles d'interférer avec le test MTT et de conduire à des estimations erronées de la viabilité des tissus. Les produits chimiques d'essai sont susceptibles d'interférer avec le test MTT par réduction directe du MTT en formazan bleu et/ou par interférence de couleurs si le produit chimique d'essai absorbe, naturellement ou sous l'effet des procédures du traitement, dans la même plage de DO que le formazan (c'est-à-dire autour de 570 nm). Des vérifications préliminaires sont effectuées avant

le test, pour permettre de repérer les éventuels produits chimiques réducteurs directs du MTT et/ou provoquant une interférence de couleurs, et des témoins supplémentaires sont préparés pour détecter les interférences pouvant être causées par ces produits chimiques et corriger l'essai en conséquence (voir paragraphes 37-41). Cela est particulièrement important lorsque le produit chimique d'essai n'a pas été totalement éliminé du modèle d'EChR lors du rinçage, ou lorsqu'il pénètre dans le modèle d'épithélium cornéen et est donc présent dans le tissu d'EChR au moment où le test MTT est mené. Pour les produits chimiques d'essai qui absorbent la lumière dans la même plage que le formazan (naturellement ou après traitement), et qui sont incompatibles avec la mesure de l'absorbance (DO) du formazan à cause d'une interférence excessive (absorption élevée à 570 ± 30 nm), une procédure d'analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie peut être effectuée pour mesurer la présence de formazan (voir paragraphes 41 et 42) (11)(36). On trouvera dans les modes opératoires normalisés des MRV (34)(35) une description détaillée de la manière de détecter la réduction directe du MTT ou les interférences dues aux agents colorants et corriger l'essai en conséquence. Un organigramme présentant les étapes pour identifier et prendre en compte les produits chimiques réducteurs directs du MTT et/ou qui provoquent une interférence de couleurs dans les MRV1 et MRV2 est par ailleurs fourni dans les appendices 3 et 4, respectivement.

37. Pour repérer les interférences potentielles par des produits chimiques d'essai absorbant la lumière dans la même plage que le formazan (naturellement ou après traitement), et pour déterminer si des témoins supplémentaires sont nécessaires, le produit chimique d'essai est mélangé à de l'eau et/ou de l'isopropanol et incubé pendant une durée appropriée à température ambiante (voir appendice 2, (34)(35)). Si le produit chimique d'essai dans l'eau et/ou dans l'isopropanol absorbe assez la lumière à une longueur d'onde de 570 ± 20 nm pour la MRV1 (voir appendice 3), ou si l'on obtient une solution colorée en mélangeant le produit chimique d'essai avec de l'eau pour la MRV2 (voir appendice 4), alors on considère que le produit chimique d'essai interfère avec la mesure de l'absorbance (DO) du formazan et des témoins colorés doivent être préparés, ou bien une procédure d'analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est employée et aucun témoin supplémentaire n'est nécessaire (voir paragraphes 41 et 42 et appendices 3 et 4)(34)(35). Lorsque les mesures d'absorbance (DO) sont effectuées, chaque produit chimique d'essai causant une interférence est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus viables, et les deux réplicats sont soumis à la procédure d'essai complète, à la seule différence qu'ils sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape de l'incubation avec MTT, afin de générer un témoin de couleur non spécifique dans les tissus vivants (CNS_{vivants}) (34)(35). Le témoin CNS_{vivants} est testé en parallèle de l'essai avec le

produit chimique d'essai coloré et, dans le cas d'un essai multiple, un témoin $CNS_{vivants}$ indépendant est effectué pour chaque essai (dans chaque épreuve) pour tenir compte de la variabilité biologique inhérente aux tissus vivants. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une interférence et incubés avec la solution MTT ($\%viabilité_{test}$) moins le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT en parallèle de l'essai à corriger ($\%CNS_{vivants}$), soit Viabilité tissulaire réelle = $[\%viabilité_{test}] - [\%CNS_{vivants}]$.

38. Afin d'identifier les agents réducteurs directs du MTT, il convient d'ajouter chaque produit chimique d'essai à un milieu MTT fraîchement préparé. Une quantité adéquate de produit chimique d'essai est ajoutée à une solution MTT et le mélange est incubé pendant environ 3 heures dans les conditions de culture normalisées (voir appendices 3 et 4)(34)(35). Si le mélange de MTT et de produit chimique d'essai (ou la suspension testée pour les produits chimiques d'essai insolubles) devient bleu/violet, on considère que le produit chimique d'essai est un réducteur direct du MTT et il convient alors de procéder à des vérifications fonctionnelles supplémentaires sur les modèles de tissus d'EChR non viables, indépendamment du choix de mesurer l'absorbance (OD) ou de procéder par analyse par CLHP/CLUP-spectrophotométrie. Cette vérification s'effectue sur des tissus tués qui ne présentent qu'une activité métabolique résiduelle, mais absorbent et retiennent le produit chimique d'essai dans des proportions similaires aux tissus viables. Dans la MRV1, les tissus tués sont préparés par exposition à des températures basses («tués par congélation»). Dans la MRV2, les tissus tués sont préparés par une incubation longue (au moins $24 \pm 1h$, par exemple) dans l'eau suivie d'un stockage à basse température («tués dans l'eau»). Chaque produit chimique réducteur du MTT est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la procédure d'essai complète pour générer un témoin de réduction non spécifique du MTT (NSMTT) (34)(35). Un seul témoin NSMTT par produit chimique d'essai suffit, indépendamment du nombre d'épreuves indépendantes menées. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au réducteur du MTT ($\%viabilité_{test}$) moins le pourcentage de réduction non spécifique du MTT obtenu pour les tissus tués exposés au même réducteur du MTT et calculé en proportion du témoin négatif testé en parallèle de l'essai à corriger ($\%NSMTT$), soit Viabilité tissulaire réelle = $[\%viabilité_{test}] - [\%NSMTT]$.
39. Dans le cas des produits chimiques identifiés comme causant à la fois une interférence de couleurs (voir paragraphe 37) et une réduction directe du MTT (voir

paragraphe 38), une troisième série de témoins est nécessaire lors de la mesure de l'absorbance (DO), en plus des témoins NSMTT et CNS_{vivants} décrits aux paragraphes précédents. En général, ce cas se présente pour les produits chimiques d'essai foncés qui absorbent la lumière à une longueur d'onde de 570±30 nm (bleus, violets, noirs, par exemple), car leur couleur intrinsèque empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT décrite au paragraphe 38. Cela rend la réalisation des témoins NSMTT et CNS_{vivants} obligatoires par principe. Les produits chimiques d'essai nécessitant la réalisation des deux témoins NSMTT et CNS_{vivants} sont susceptibles d'être absorbés et retenus à la fois par les tissus vivants et par les tissus tués. Par conséquent et dans ce cas, l'utilisation du témoin NSMTT peut permettre de corriger l'essai non seulement en fonction du potentiel de réduction directe du MTT du produit chimique d'essai, mais aussi de l'interférence de couleurs due à l'absorption et la rétention du produit chimique d'essai par les tissus tués. Cela signifie qu'une double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs peut devoir être effectuée, étant donné que le témoin CNS_{vivants} permet déjà de tenir compte de l'interférence de couleurs due à l'absorption et à la rétention du produit chimique d'essai par les tissus vivants. Afin d'éviter cette double correction pour tenir compte de l'interférence de couleurs, un troisième témoin pour la couleur non spécifique dans les tissus tués (CNS_{tués}) doit être préparé (voir appendice 3 et 4)(34)(35). Dans ce témoin supplémentaire, le produit chimique d'essai est appliqué sur au moins deux réplicats de tissus tués qui sont soumis à la procédure d'essai complète mais qui sont incubés dans le milieu plutôt que dans la solution MTT lors de l'étape d'incubation avec MTT. Un seul témoin CNS_{tués} par produit chimique d'essai suffit, indépendamment du nombre d'épreuves, mais il doit être mené en parallèle du témoin NSMTT et sur le même lot de tissus. La viabilité tissulaire réelle est calculée comme suit: le pourcentage de viabilité tissulaire obtenu pour les tissus vivants exposés au produit chimique d'essai (%viabilité_{test}) moins %NSMTT moins %CNS_{vivants} plus le pourcentage de couleur non spécifique obtenu pour les tissus tués exposés au produit chimique d'essai causant une interférence et incubés dans du milieu sans MTT, calculé en proportion du témoin négatif mené en parallèle de l'essai à corriger (%CNS_{tués}), soit

$$\text{Viabilité tissulaire réelle} = [\% \text{viabilité}_{\text{test}}] - [\% \text{NSMTT}] - [\% \text{CNS}_{\text{vivants}}] + [\% \text{CNS}_{\text{tués}}].$$

40. Il importe de noter qu'une réduction non spécifique du MTT et des interférences de couleurs non spécifiques peuvent porter l'absorbance (DO) de l'extrait tissulaire au-dessus de la plage de linéarité du spectrophotomètre (lors des mesures de densité optique), et qu'une réduction non spécifique du MTT peut aussi élargir la surface de pic de formazan de l'extrait tissulaire au-delà de la plage de linéarité du spectrophotomètre (lors des mesures par CLHP/CLUP-spectrophotométrie). Il est

donc important que chaque laboratoire détermine la plage de linéarité de son spectrophotomètre (pour la DO/surface de pic), par exemple à l'aide de formazan (CAS # 57360-69-7), disponible dans le commerce auprès de l'entreprise Sigma-Aldrich (Cat# M2003), avant de tester les produits chimiques à des fins réglementaires.

41. La mesure standard de l'absorbance (DO) avec un spectrophotomètre est indiquée pour l'évaluation des produits chimiques d'essai réducteurs directs du MTT et causant une interférence de couleurs, lorsque l'interférence observée n'est pas trop forte par rapport à la mesure (c'est-à-dire lorsque les DO des extraits tissulaires obtenues pour le produit chimique d'essai sans correction pour tenir compte de la réduction directe du MTT et/ou de l'interférence de couleurs sont comprises dans la plage de linéarité du spectrophotomètre). Cependant, les résultats correspondant aux produits chimiques d'essai pour lesquels les valeurs %NSMTT et/ou %CNS_{vivants} sont $\geq 60\%$ (MRV1, et MRV2 pour le protocole des liquides) ou 50% (MRV2 pour le protocole des solides) du témoin négatif doivent être utilisés avec précaution, car il s'agit des seuils retenus dans les MRV pour faire la distinction entre les produits chimiques relevant d'une catégorie et ceux «sans catégorie» (voir paragraphe 44). A contrario, l'absorbance (DO) ne peut pas être mesurée lorsque l'interférence avec la mesure du formazan est trop forte (c'est-à-dire lorsque les DO non corrigées des extraits tissulaires testés sont situées en dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre). Les produits chimiques d'essai colorés ou ceux devenant colorés au contact de l'eau ou de l'isopropanol qui interfèrent trop fortement avec l'absorbance (DO) mesurée pour le formazan peuvent être évalués par une procédure de CLHP/CLUP-spectrophotométrie (voir appendices 3 et 4), car le système CLHP/CLUP permet de séparer le formazan du produit chimique avant la quantification (36). Pour cette raison, les témoins CNS_{vivants} et CNS_{tués} ne sont pas nécessaires pour la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie, quel que soit le produit chimique soumis à l'essai. Les témoins NSMTT sont néanmoins nécessaires si l'on s'attend à ce que le produit chimique d'essai soit un réducteur direct du MTT (en suivant la procédure décrite au paragraphe 38). Les témoins NSMTT sont aussi nécessaires pour les produits chimiques d'essai colorés (naturellement ou au contact de l'eau) dont la couleur empêche l'évaluation de leur potentiel de réduction directe du MTT, comme décrit au paragraphe 38. Lorsqu'une procédure par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est employée pour quantifier le formazan, la viabilité tissulaire est calculée en pourcentage par comparaison de la surface de pic de formazan obtenue avec des tissus vivants exposés au produit chimique d'essai avec la surface de pic de formazan obtenue avec le témoin négatif parallèle. Pour les produits chimiques d'essai réducteurs directs du MTT, la viabilité tissulaire réelle est calculée comme

suit: $\%viabilité_{test} \text{ moins } \%NSMTT$, comme décrit à la dernière phrase du paragraphe 38. Pour finir, il convient de noter que les réducteurs directs du MTT ou les réducteurs directs du MTT causant aussi une interférence de couleurs, qui sont retenus dans les tissus après le traitement et dont la capacité de réduction du MTT est telle qu'elle conduit à des DO (pour la mesure de DO) ou à des surfaces de pic (pour la procédure CLHP/CLUP-spectrophotométrie) des extraits tissulaires testés situées en dehors de la plage de linéarité du spectrophotomètre, ne peuvent pas être évalués avec les méthodes d'essai sur EChR; ce cas ne se présente a priori que très rarement.

42. La procédure par CLHP/CLUP-spectrophotométrie est utilisable pour mesurer le formazan pour tous les types de produits chimiques (colorés ou non, réducteurs ou non réducteurs du MTT) (11)(36). Étant donné la diversité des équipements de CLHP/CLUP-spectrophotométrie, tous les utilisateurs ne pourront pas reproduire des conditions d'équipement identiques. Pour cette raison, preuve doit être faite de l'efficacité de l'équipement de CLHP/CLUP-spectrophotométrie avant que celui-ci ne soit utilisé pour quantifier le formazan des extraits tissulaires, en remplissant les critères d'acceptabilité pour un ensemble de paramètres normalisés de qualification inspirés des paramètres décrits dans les recommandations à l'industrie de la *Food and Drug Administration* des États-Unis sur la validation des méthodes de bio-analyse (36)(38). Ces paramètres fondamentaux et leurs critères d'acceptation sont fournis à l'appendice 5. Une fois que les critères d'acceptabilité définis à l'appendice 5 ont été remplis, l'équipement de CLHP/CLUP-spectrophotométrie est considéré comme ayant fait la preuve de son efficacité et prêt pour les mesures du formazan dans les conditions expérimentales décrites dans la présente méthode d'essai.

Critères d'acceptation

43. Pour chaque épreuve recourant à des lots de tissus d'EChR remplissant les critères du contrôle de qualité (voir paragraphe 30), les tissus traités avec le témoin négatif présentent une DO reflétant la qualité des tissus qui ont été transportés, réceptionnés et soumis à toutes les étapes du protocole et se situant dans les limites historiques décrites au tableau 2 (voir paragraphe 26). De même, les tissus traités avec le témoin positif, c'est-à-dire l'acétate de méthyle, présentent une viabilité cellulaire $< 50 \%$ par comparaison avec le témoin négatif pour la MRV1 soit avec le protocole des liquides, soit avec le protocole des solides, et une viabilité cellulaire $\leq 30 \%$ (protocole pour des liquides) ou $\leq 20 \%$ (protocole des solides) pour la MRV2. Ces valeurs reflètent la capacité des tissus à réagir à un produit chimique irritant dans les conditions de la méthode d'essai (34)(35). La variabilité entre les réplicats de tissus pour les produits chimiques d'essai et pour les substances témoin doit se situer dans la fourchette acceptable (différence de viabilité entre deux réplicats de tissus inférieure à 20% , ou

écart-type entre trois réplicats de tissus ne dépassant pas 18 %). Si l'un des témoins (négatif ou positif) réalisés dans une épreuve se situe en dehors de la fourchette acceptable, l'épreuve est considérée comme «non valable» et doit être refaite. Si la variabilité entre les réplicats de tissus pour un produit chimique d'essai se situe en dehors de la fourchette acceptable, l'essai est considéré comme «non valable» et le produit chimique doit être à nouveau soumis à l'essai.

Interprétation des résultats et modèle prédictif

44. Les valeurs de DO/surfaces de pic obtenues avec les réplicats d'extraits de tissus pour chaque produit chimique d'essai sont utilisées pour calculer le pourcentage moyen de viabilité tissulaire (moyenne entre les réplicats de tissus) par rapport à la viabilité du témoin négatif (fixée à 100 %). La valeur seuil du pourcentage de viabilité tissulaire, qui permet de distinguer les produits chimiques relevant d'une catégorie pour irritation oculaire ou lésions oculaires graves de ceux «sans catégorie» selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP, est donnée au tableau 4. Les résultats sont donc interprétés comme suit:

- Le produit chimique d'essai est considéré comme ne relevant d'aucune catégorie selon le SGH de l'ONU et le règlement CLP («sans catégorie») si le pourcentage moyen de viabilité cellulaire après l'exposition et l'incubation post-traitement est supérieur (>) au seuil défini du pourcentage de viabilité tissulaire, conformément au tableau 4. Dans ce cas, aucun essai supplémentaire avec d'autres méthodes d'essai n'est nécessaire.
- Aucune prédiction n'est possible si le pourcentage moyen de viabilité cellulaire après l'exposition et l'incubation post-traitement est inférieur ou égal ($\leq$) au seuil défini du pourcentage de viabilité tissulaire, conformément au tableau 4. Dans ce cas, il est nécessaire de mener des essais supplémentaires avec d'autres méthodes d'essai, car les méthodes d'essai sur EChR produisent un nombre non négligeable de faux positifs (voir paragraphes 14 et 15) et ne permettent pas de distinguer entre les catégories 1 et 2 du SGH de l'ONU et le règlement CLP (voir paragraphe 17).

Tableau 4: Modèles de prédiction d'après la classification du SGH de l'ONU et du règlement CLP

MRV	Sans Catégorie	Aucune prédiction possible
MRV1 - TIO EpiOcular™ (pour les deux protocoles)	Viabilité tissulaire moyenne > 60%	Viabilité tissulaire moyenne $\leq$ 60%
MRV2 - TIO HCE SkinEthic™ (pour le protocole des liquides))	Viabilité tissulaire moyenne > 60%	Viabilité tissulaire moyenne $\leq$ 60%

MRV2 - TIO HCE SkinEthic™ (pour le protocole des solides)	Viabilité tissulaire moyenne > 60%	Viabilité tissulaire moyenne ≤ 60%

45. Un seul essai réalisé à l'aide d'au moins deux réplicats de tissus devrait suffire pour tester un produit chimique dont les résultats sont sans équivoque. En revanche, dans le cas de résultats ambigus, tels que des mesures non concordantes pour les différents réplicats et/ou un pourcentage moyen de viabilité égal à 60 ± 5 % (MRV1, et MRV2 pour le protocole des liquides) ou 50 ± 5 % (MRV2 pour le protocole des solides), une seconde répétition est envisagée, voire une troisième en cas de résultats discordants entre les deux premières.
46. Il est envisageable d'utiliser des valeurs seuil de pourcentage de viabilité tissulaire différentes pour distinguer les produits chimiques relevant ou ne relevant pas d'une catégorie dans certains cas particuliers de mélanges, si nécessaire et justifiable, pour améliorer la performance générale de la méthode d'essai concernant ces types de mélanges (voir paragraphe 14). Les produits chimiques étalons peuvent s'avérer utiles pour évaluer le potentiel de lésions oculaires graves/d'irritation oculaire de produits chimiques ou de mélanges inconnus relevant de classes spécifiques de substances chimiques ou de produits, ou encore pour évaluer le potentiel relatif de toxicité oculaire d'un produit chimique classé dans une gamme spécifique de réactions d'irritation.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Données

47. Les données de chaque réplikat de tissus dans une épreuve (valeurs DO/surfaces de pic de formazan, données calculées du pourcentage de viabilité tissulaire pour le produit chimique d'essai et pour le témoin, prédiction conclusive de la méthode d'essai sur EChR, par exemple) sont présentées dans un tableau pour chacun des produits chimiques d'essai, y compris les données des répétitions, le cas échéant. De plus, le pourcentage moyen de viabilité tissulaire et la différence (si $n=2$ réplicats de tissus) ou l'écart-type (si $n \geq 3$ réplicats de tissus) pour chacun des produits chimiques d'essai et pour les témoins sont présentés. Toute interférence avec le test MTT observée pour un produit chimique d'essai à cause de la réduction directe du MTT et/ou d'une interférence de couleurs est indiquée pour chacun des produits chimiques soumis à essai.

Rapport d'essai

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

Produit chimique d'essai

Substance mono-constituant

- identification chimique, telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants;
- état physique, volatilité, pH, LogP, poids moléculaire, classe chimique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, selon les données disponibles;
- pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Substance multi-constituants, UVCB ou mélange

- caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles;
- état physique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, selon les données disponibles;
- pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Témoins positifs et négatifs

- identification chimique telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants;
- état physique, volatilité, pH, LogP, poids moléculaire, classe chimique et autres propriétés physico-chimiques pertinentes pour la conduite de l'essai, selon les données disponibles;
- pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.;
- traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple);
- conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles;

- justification de l'utilisation d'un témoin négatif autre que l'eau (H₂O) extra-pure ou que le DPBS sans Ca²⁺/Mg²⁺, le cas échéant;
- justification de l'utilisation d'un témoin positif autre que l'acétate de méthyle pur, le cas échéant;
- référence aux données historiques des témoins positifs et négatifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité.

Renseignements relatifs au donneur d'ordre et à l'installation d'essai

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude.

Modèle d'EChR et protocole employés (explication des raisons du choix, le cas échéant)

Conditions de la méthode d'essai

- modèle tissulaire d'EChR employé, y compris le numéro de lot;
- longueur d'onde et largeur de bande (le cas échéant) employées pour quantifier le bleu de formazan, et plage de linéarité de l'appareil de mesure (par exemple spectrophotomètre);
- description de la méthode de quantification du bleu de formazan employée;
- description du système CLHP/CLUP-spectrophotomètre utilisé, le cas échéant;
- informations complètes sur le modèle spécifique d'EChR utilisé, notamment sur ses performances, à savoir (liste non limitative):
 - i) viabilité lors du contrôle qualité (fournisseur);
 - ii) viabilité dans les conditions de la méthode d'essai (utilisateur);
 - iii) fonction de barrière lors du contrôle qualité;
 - iv) morphologie, selon les informations disponibles;
 - v) reproductibilité et valeur prédictive;
 - vi) autre contrôle de qualité (CQ) des modèles tissulaires d'EChR, selon les informations disponibles;
- références aux données historiques du modèle tissulaire d'EChR, à savoir (liste non limitative): acceptabilité des données de CQ par rapport aux données historiques des lots;
- déclaration de démonstration de la compétence du laboratoire dans l'application de la méthode d'essai (en testant les substances d'épreuve) avant son application en routine.

Critères d'acceptabilité pour les épreuves et pour l'essai

- moyennes et fourchettes de valeur acceptables pour les témoins positifs et négatifs, sur la base des données historiques;
- variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour les témoins positifs et négatifs;
- variabilité acceptable entre les réplicats de tissus pour les produits chimiques d'essai;

Mode opératoire

- détails du protocole utilisé;
- doses employées pour le produit chimique d'essai et les substances témoin;
- durée et température des périodes d'exposition, d'immersion post-traitement et d'incubation post-traitement (le cas échéant);
- description de toute modification éventuelle du protocole;
- indication des témoins utilisés pour les agents réducteurs directs du MTT et/ou pour les produits chimiques d'essai colorés, le cas échéant;
- nombre de réplicats de tissus utilisés par produit chimique d'essai et substance témoin (témoin positif, témoin négatif, NSMTT, CNS_{vivants} et CNS_{tués}, le cas échéant);

Résultats

- tableau de données pour chaque produit chimique d'essai et substance témoin pour chaque épreuve (et ses répétitions, le cas échéant) et pour les mesures de chaque réplikat, y compris la valeur de DO ou la surface de pic du formazan, le pourcentage de viabilité tissulaire, le pourcentage moyen de viabilité tissulaire, la différence ou l'écart-type entre les réplicats de tissus, et la prédiction finale;
- le cas échéant, résultats des témoins réalisés pour les réducteurs directs du MTT et/ou les produits chimiques colorés, y compris la valeur de DO ou la surface de pic du formazan, %NSMTT, %CNS_{vivants}, %CNS_{tués}, différence ou écart-type entre les réplicats de tissus, pourcentage final corrigé de viabilité tissulaire, et prédiction finale;
- résultats obtenus pour le(s) produit(s) chimique(s) testé(s) et les substances témoin comparés aux critères d'acceptation pour les épreuves et pour l'essai;
- description des autres effets observés, par exemple, coloration des tissus par un produit chimique d'essai coloré;

Discussion des résultats

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Nations Unies (ONU) (2015). Système Général Harmonisé de Classification et d'Etiquetage des Produits Chimiques (SGH). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixième édition révisée, New York et Genève: Nations Unies. Disponible à l'adresse:
http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.
- (2) Chapitre B.5 de la présente annexe, Effet irritant/corrosif aigu sur les yeux.
- (3) Chapitre B.47 de la présente annexe, Méthode d'essai d'opacité et de perméabilité de la cornée bovine pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves ou ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire .
- (4) Chapitre B.48 de la présente annexe, méthode d'essai sur œil de poulet isolé pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves et ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire .
- (5) Chapitre B.61 de la présente annexe, Méthode d'essai de diffusion de fluorescéine pour identifier les substances corrosives et fortement irritantes pour l'œil.
- (6) Chapitre B.68 de la présente annexe, Méthode d'essai d'exposition de courte durée in vitro pour l'identification des produits chimiques i) provoquant des lésions oculaires graves ou ii) ne relevant d'aucune classification pour irritation oculaire ou lésion oculaire .
- (7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010, 261-266.
- (8) EC EURL ECVAM (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Available at: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280>.
- (9) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR

28173 EN; doi: 10.2787/043697. Available at:
<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702>.

- (10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D., Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.
- (11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.
- (12) EURL ECVAM Science Advisory Committee (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28175 EN; doi: 10.2787/390390. Available at:
<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704>.
- (13) EC EURL ECVAM (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in Preparation).
- (14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. *Journal of Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.
- (15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.
- (16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- (17) OCDE (2016). Series on Testing and Assessment No 216: Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro*

Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

- (18) OCDE (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.
- (20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), *Alternative Toxicological Methods*, CRC Press, pp. 147-159.
- (21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.
- (22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.
- (23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.
- (24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In*

Vivo Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

- (25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.
- (26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.
- (27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N. and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.
- (28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons* Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.
- (29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.
- (30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.
- (31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.
- (32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.
- (33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.

- (34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Available at: <https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index>.
- (36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.
- (37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.
- (38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- (39) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

Appendice 1

DÉFINITIONS

Précision: degré de conformité entre les résultats d'une 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. Ce terme et le terme «concordance» sont souvent utilisés indifféremment pour qualifier la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai (18).

Produit chimique étalon: produit chimique utilisé comme référence dans une comparaison avec un produit chimique d'essai. Un produit chimique étalon doit posséder les propriétés suivantes: (i) provenir d'une ou de plusieurs sources régulières et fiables permettant de l'identifier et de le caractériser; (ii) présenter une similitude structurale et/ou fonctionnelle avec la classe des produits chimiques d'essai; (iii) posséder des caractéristiques physiques et chimiques connues; (iv) être accompagné de données confirmant ses effets connus; et (v) avoir une puissance connue dans l'intervalle de la réponse désirée.

Approche «bottom-up»: approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé ne pas nécessiter de classification ou étiquetage pour irritation oculaire ou lésion oculaire grave, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques ne relevant d'aucune classification ni étiquetage (résultat négatif) des autres produits chimiques (résultat positif).

Produit chimique: substance ou mélange.

Concordance: Voir «Précision».

Cornée: Partie transparente située à l'avant du globe oculaire, recouvrant l'iris et la pupille et laissant pénétrer la lumière vers l'intérieur de l'œil.

CV: Coefficient de variation.

Dev: Deviation.

TIO: Test d'irritation oculaire.

EURL ECVAM: Laboratoire de référence de l'Union Européenne pour la validation de méthodes alternatives.

Irritation oculaire: modification de l'œil provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui est totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec «Effets réversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP».

TE₅₀: temps d'exposition nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application d'un produit chimique étalon à une concentration fixe spécifiée.

Taux de faux négatifs: proportion de produits chimiques positifs faussement identifiés comme négatifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Taux de faux positifs: proportion de produits chimiques négatifs faussement identifiés comme positifs par une méthode d'essai. Il s'agit d'un indicateur de performance de la méthode d'essai.

Danger: propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets néfastes lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-)population est exposé(e) à cet agent.

HCE: épithélium cornéen humain du SkinEthic™.

CLHP: chromatographie en phase liquide à haute performance.

CI₅₀: concentration nécessaire pour réduire la viabilité cellulaire de 50 % après application d'un produit chimique étalon pendant un temps d'exposition fixe (traitement de 30 minutes au SDS, par exemple).

Dose infinie: quantité de produit chimique d'essai appliquée sur le modèle tissulaire d'EChR qui dépasse la quantité requise pour recouvrir entièrement et uniformément la surface épithéliale.

Effets irréversibles sur l'œil: voir «lésions oculaires graves».

VLIQ: valeur limite inférieure de quantification.

LogP: logarithme du coefficient de partage octanol/eau

Mélange: mélange ou solution composé de deux substances ou plus.

Substance mono-constituant: substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à une concentration d'au moins 80 % (m/m).

Substance multi-constituants: substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent à une concentration comprise entre 10 % et 80 % (m/m). Une substance multi-constituants résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multi-constituants est que le mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans réaction chimique. Une substance multi-constituants résulte d'une réaction chimique.

MTT: bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium; bleu de thiazolyl; bromure de tétrazolium.

Témoin négatif: échantillon contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour ne pas induire de réponse positive du système d'essai. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec le produit chimique d'essai et les autres échantillons témoins et sert à déterminer la viabilité tissulaire de 100 %.

Non classé: produit chimique ne relevant d'aucune classification pour l'irritation oculaire (catégorie 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP, catégorie 2A ou 2B du SGH de l'ONU) ou pour des lésions oculaires graves (catégorie 1 du SGH de l'ONU/du règlement CLP). Ce terme est interchangeable avec «Sans catégorie».

CNS_{tués}: couleur non spécifique dans les tissus tués.

CNS_{vivants}: couleur non spécifique dans les tissus vivants.

NSMTT: Réduction non spécifique du MTT.

DO: densité optique.

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée et considérée comme scientifiquement valide, permettant d'évaluer la comparabilité d'une méthode d'essai proposée structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: (i) les éléments essentiels de la méthode d'essai, (ii) une liste minimale de produits chimiques de référence choisis parmi ceux utilisés pour démontrer les performances acceptables de la méthode d'essai validée, et (iii) 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 (18).

Témoin positif: échantillon contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Cet échantillon subit les mêmes procédures que les échantillons traités avec la substance testée et les autres échantillons témoins. Pour permettre d'évaluer la variabilité de la réponse du témoin positif dans le temps, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être excessive.

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 (18).

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 en calculant la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires ainsi que la répétabilité intra-laboratoire (18).

Essai substitutif: essai conçu pour remplacer un essai utilisé en routine et accepté, servant à l'identification des dangers et/ou à l'évaluation de risques, et dont il a été démontré qu'il assure, par rapport à l'essai accepté, une protection équivalente ou accrue de la santé humaine ou animale ou de l'environnement, selon les cas, pour toutes les situations et produits chimiques d'essai possibles (18).

Reproductibilité: accord entre les résultats obtenus lors d'essais pratiqués sur le même produit chimique selon le même mode opératoire (voir «Fiabilité») (18).

Effets réversibles sur l'œil: voir «Irritation oculaire».

EChR: épithélium cornéen humain reconstitué.

Épreuve: consiste à tester un ou plusieurs produits chimiques parallèlement à un témoin négatif et à un témoin positif.

ET: Écart-type.

Sensibilité: proportion des produits chimiques positifs/actifs correctement classés 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 (18).

Lésion oculaire grave: lésion des tissus oculaires ou dégradation sévère de la vue, provoquée par l'application d'un produit chimique d'essai sur la face antérieure de l'œil, et qui n'est pas totalement réversible dans les 21 jours suivant l'application. Interchangeable avec «Effets irréversibles sur l'œil» et avec «Catégorie 1 du SGH de l'ONU et du règlement CLP».

Mode opératoire normalisé: procédure écrite formelle décrivant en détail les modalités de réalisation en laboratoire de certaines opérations effectuées en routine ou dans le cadre d'un essai particulier. Le respect du mode opératoire normalisé fait partie des bonnes pratiques de laboratoire.

Spécificité: proportion des produits chimiques d'essai négatifs/inactifs qui sont correctement classés 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 (18).

Substance: élément chimique et ses composés, présents à l'état naturel ou obtenus grâce à un procédé de production. Ce terme inclut tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit ainsi que toute impureté produite par le procédé utilisé, mais exclut tout solvant pouvant être extrait sans affecter la stabilité ni modifier la composition de la substance.

Essai: consiste à tester en parallèle un même produit chimique sur au minimum deux réplicats de tissus, tel que défini dans le mode opératoire normalisé correspondant.

Viabilité tissulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire dans un modèle tissulaire, définie comme sa capacité à réduire le colorant vital MTT, qui selon l'effet mesuré et le protocole utilisé pour l'essai, est en corrélation avec le nombre total et/ou la vitalité des cellules.

Approche «top-down»: approche en plusieurs étapes appliquée à un produit chimique présumé provoquer des lésions oculaires graves, et dont la première étape consiste à distinguer les produits chimiques provoquant des lésions oculaires graves (résultat positif) des autres produits chimiques (résultat négatif).

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la présente méthode d'essai«».

Stratégie d'essai à plusieurs niveaux: démarche expérimentale séquentielle consistant à examiner toutes les informations existantes sur un produit chimique d'essai dans un ordre déterminé, en ayant recours à chaque étape à un processus d'analyse du poids de la preuve afin de déterminer si les informations disponibles sont suffisantes pour décider d'une classification dans une catégorie de danger, avant de passer à l'étape suivante. Si le danger potentiel ou l'ampleur du danger présenté par un produit chimique d'essai peut être déterminé sur la base des informations existantes à une étape donnée, aucun essai supplémentaire n'est nécessaire (18).

VLSQ: valeur limite supérieure de quantification.

SGH (Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies): système proposant la classification des produits chimiques (substances et mélanges) conformément à des types et des niveaux normalisés de dangers physiques, sanitaires et environnementaux, ainsi que la communication des éléments d'information correspondants, notamment par des pictogrammes, mentions d'avertissement, mentions de danger, conseils de prudence et fiches de données de sécurité, afin de diffuser des informations sur leurs effets indésirables dans l'objectif de protéger les personnes (en particulier les employeurs, employés, transporteurs, consommateurs et personnels des services d'urgence) et l'environnement (1).

Catégorie 1 du SGH de l'ONU et du règlement CLP: voir «Lésion oculaire grave».

Catégorie 2 du SGH de l'ONU et du règlement CLP: voir «Irritation oculaire».

Sans catégorie selon le SGH de l'ONU et règlement CLP: produit chimique ne relevant pas d'une classification dans la catégorie 1 ou 2 du SGH de l'ONU/du règlement CLP (ou dans la catégorie 2A ou 2B du SGH de l'ONU). Terme interchangeable avec «Non classé».

CLUP: chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance.

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

Méthode d'essai valide: méthode d'essai dont la pertinence et la fiabilité sont jugées satisfaisantes pour des fins spécifiques, et qui repose sur des principes scientifiquement valables. Une méthode d'essai n'est jamais valide dans l'absolu, mais seulement par rapport à une fin particulière (18).

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 (18).

MRV: Méthode de référence validée.

MRV1: le TIO EpiOcular™ est désigné Méthode de référence validée 1.

MRV2: le TIO HCE SkinEthic™ est désigné Méthode de référence validée 2.

Poids de la preuve: Prise en compte des atouts et des faiblesses de divers éléments d'information en vue d'aboutir à une conclusion concernant le danger potentiel d'un produit chimique d'essai et d'étayer cette conclusion.

Appendice 2

PRINCIPAUX ÉLÉMENTS DES ESSAIS SUR ECHR VALIDÉS POUR L'IDENTIFICATION DE PRODUITS CHIMIQUES NE NÉCESSITANT AUCUNE CLASSIFICATION NI ÉTIQUETAGE POUR IRRITATION OCULAIRE OU LÉSIONS OCULAIRES GRAVES

Éléments de l'essai	TIO EpiOcular™ (MRV1)		TIO HCE SkinEthic™ (MRV2)	
	Liquides (applicables à la pipette à 37±1°C ou à des températures inférieures pendant 15 min)	Solides (non applicables à la pipette)	Liquides et visqueux (applicables à la pipette)	Solides (non applicables à la pipette)
Protocoles				
Surface du modèle	0,6 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²	0,5 cm ²
Nombre de réplicats de tissus	Au moins 2	Au moins 2	Au moins 2	Au moins 2

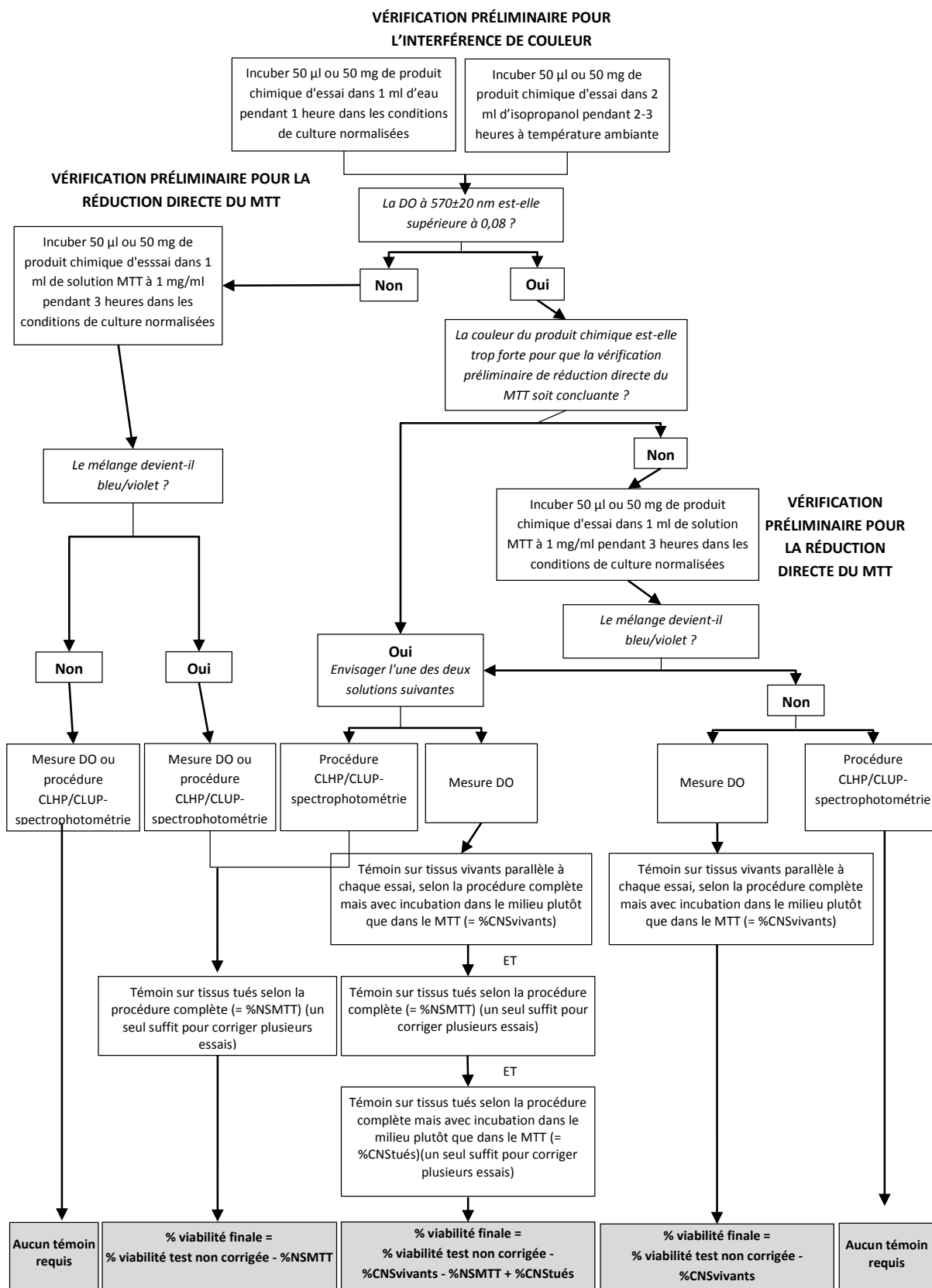
Éléments de l'essai	TIO EpiOcular™ (MRV1)		TIO HCE SkinEthic™ (MRV2)	
Pré-vérification des interférences de couleur	50 µl + 1 ml H₂O pendant 60 min à 37±2°C, sous CO₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %(produits chimiques d'essai incolores), ou 50 µl + 2 ml isopropanol mélangés pendant 2-3 h à TA (produits chimiques d'essai colorés) → si la DO du produit chimique d'essai à 570±20 nm, après soustraction de la DO de l'isopropanol ou de l'H₂O, est > 0,08 (soit approximativement 5 % de la DO moyenne du témoin négatif), il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.	50 mg + 1 ml H₂O pendant 60 min à 37±2°C, sous CO₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %(produits chimiques d'essai incolores), et/ou 50 mg + 2 ml isopropanol mélangés pendant 2-3 h à TA (produits chimiques d'essai colorés et non colorés) → si la DO du produit chimique d'essai à 570±20 nm, après soustraction de la DO de l'isopropanol ou de l'H₂O, est > 0.08 (soit approximativement 5 % de la DO moyenne du témoin négatif), il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.	10 µl + 90 µl H₂O mélangés pendant 30±2 min à température ambiante (TA, 18-28°C) → si le produit chimique d'essai est coloré, il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.	10 mg + 90 µl H₂O mélangés pendant 30±2 min à TA → si le produit chimique d'essai est coloré, il convient de réaliser des essais avec des témoins vivants adaptés.
Pré-vérification de la réduction directe du MTT	50 µl + 1 ml solution de MTT à 1 mg/ml pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO₂ 5±1%, HR ≥ 95% → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation (50 µl d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)	50 mg + 1 ml solution de MTT à 1 mg/ml pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO₂ 5±1%, HR ≥ 95% → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués par congélation (50 µl d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)	30 µl + 300 µl solution de MTT à 1 mg/ml pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO₂ 5±1%, HR ≥ 95% → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués dans l'eau (30 µl d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)	30 mg + 300 µl solution de MTT à 1 mg/ml pendant 180±15 min à 37±2°C, sous CO₂ 5±1%, HR ≥ 95% → si la solution devient bleue/violette, il convient de recourir à des contrôles adaptés sur tissus tués dans l'eau (30 µl d'eau distillée stérile dans une solution de MTT servent de témoin négatif)

Éléments de l'essai	TIO EpiOcular™ (MRV1)		TIO HCE SkinEthic™ (MRV2)	
Pré-traitement	20 µl DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺ pendant 30±2 min à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %, à l'abri de la lumière.	20 µl DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺ pendant 30±2 min à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %, à l'abri de la lumière.	-	-
Doses et application du traitement	50 µl (83,3 µl/cm ²)	50 mg (83,3 mg/cm ²) mesurés avec un outil calibré (une cuillère calibrée pour contenir 50 mg de chlorure de sodium, par exemple).	10 µl DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺ + 30±2 µl (60 µl/cm ²) Pour les produits visqueux, utiliser du tulle de nylon	30 µl DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺ + 30±2 mg (60 mg/cm ²)
Temps d'exposition et température	30 min (±2 min) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %	6 heures (±0,25 h) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %	30 min (±2 min) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %	4 heures (±0,1 h) dans un milieu de culture à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %
Rinçage à température ambiante	3 fois dans 100 ml de DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺	3 fois dans 100 ml de DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺	20 ml DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺	25 ml DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺
Immersion post-traitement	12 min (±2 min) à TA dans un milieu de culture	25 min (±2 min) à TA dans un milieu de culture	30 min (±2 min) à 37±2°C, sous CO ₂ 5 %, HR ≥ 95 % dans un milieu de culture	30 min (±2 min) à TA dans un milieu de culture
Incubation post-traitement	120 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 % dans un milieu de culture	18 h (±0,25 h) à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 % dans un milieu de culture	Aucune	18 h (±0,5 h) à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 % dans un milieu de culture
Témoin négatif	50 µl H ₂ O Testé en parallèle	50 µl H ₂ O Testé en parallèle	30±2 µl DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Testé en parallèle	30±2 µl DPBS sans Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Testé en parallèle
Témoin positif	50 µl acétate de méthyle Testé en parallèle	50 µl acétate de méthyle Testé en parallèle	30±2 µl acétate de méthyle Testé en parallèle	30±2 µl acétate de méthyle Testé en parallèle

Éléments de l'essai	TIO EpiOcular™ (MRV1)		TIO HCE SkinEthic™ (MRV2)	
Solution MTT	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml	300 µl 1 mg/ml
Durée et température d'incubation du MTT	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %	180 min (±15 min) à 37±2°C, sous CO ₂ 5±1 %, HR ≥ 95 %
Solvant d'extraction	2 ml isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert en perçant le tissu)	2 ml isopropanol (extraction depuis le dessous de l'insert en perçant le tissu)	1,5 ml isopropanol (extraction depuis le dessus et le dessous de l'insert)	1,5 ml isopropanol (extraction depuis le dessous de l'insert)
Durée et température d'extraction	2-3 h en agitant (~120 rpm) à TA ou une nuit à 4-10°C	2-3 h en agitant (~120 rpm) à TA ou une nuit à 4-10°C	4 h en agitant (~120 rpm) à TA ou au moins une nuit sans agiter à 4-10°C	Au moins 2 h en agitant (~120 rpm) à TA
Lecture de la DO	570 nm (550 - 590 nm) sans filtre de référence	570 nm (550-590 nm) sans filtre de référence	570 nm (540 - 600 nm) sans filtre de référence	570 nm (540 - 600 nm) sans filtre de référence
Contrôle de qualité des tissus	Traitement par 100 µl de Triton X-100 à 0,3 % (v/v) 12,2 min ≤ TE ₅₀ ≤ 37,5 min	Traitement par 100 µl de Triton X-100 à 0,3 % (v/v) 12,2 min ≤ TE ₅₀ ≤ 37,5 min	Traitement de 30 min par SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ CI ₅₀ ≤ 3,5 mg/ml	Traitement de 30 min par SDS (50 µl) 1,0 mg/ml ≤ CI ₅₀ ≤ 3,2 mg/ml
Critères d'acceptabilité	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être > 0,8 et < 2,5 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 30 min au témoin positif, exprimée en % du témoin négatif, doit être < 50 % 3. La différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %.	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être > 0,8 et < 2,5 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 6 heures au témoin positif, exprimée en % du témoin négatif, doit être < 50 % 3. La différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %.	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être > 1,0 et ≤ 2,5 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 30 min au témoin positif, exprimée en % du témoin négatif, doit être ≤ 30 % 3. La différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %.	1. La DO moyenne des réplicats de tissus traités avec le témoin négatif doit être > 1,0 et ≤ 2,5 2. La viabilité moyenne des réplicats de tissus exposés pendant 4 heures au témoin positif, exprimée en % du témoin négatif, doit être ≤ 20 % 3. La différence de viabilité entre les deux réplicats de tissus ne doit pas dépasser 20 %.

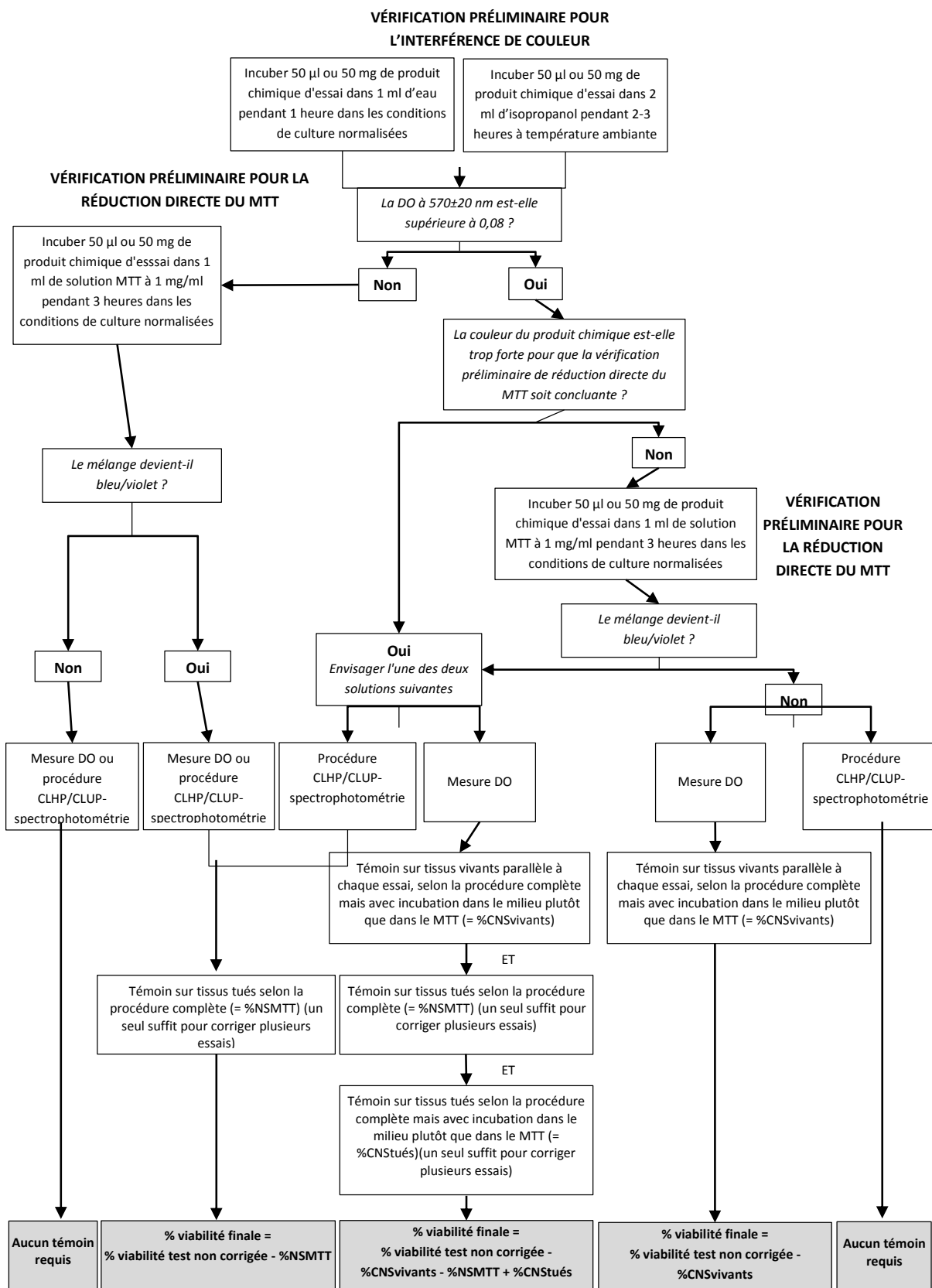
Appendice 3

LOGIGRAMME ILLUSTRATIF PRÉSENTANT UNE SUGGESTION DE PROCÉDURE POUR L'IDENTIFICATION ET LA PRISE EN COMPTE DES PRODUITS CHIMIQUES D'ESSAI RÉDUCTEURS DIRECTS DU MTT ET/OU CAUSANT UNE INTERFÉRENCE DE COULEURS, SUR LA BASE DU MODE OPÉRATOIRE NORMALISÉ DE LA MRV1



Appendice 4

**LOGIGRAMME ILLUSTRATIF PRÉSENTANT UNE SUGGESTION DE PROCÉDURE
POUR L'IDENTIFICATION ET LA PRISE EN COMPTE DES PRODUITS CHIMIQUES
D'ESSAI RÉDUCTEURS DIRECTS DU MTT ET/OU CAUSANT UNE INTERFÉRENCE
DE COULEURS, SUR LA BASE DU MODE OPÉRATOIRE NORMALISÉ DE LA MRV2**



Appendice 5

PRINCIPAUX PARAMÈTRES ET CRITÈRES D'ACCEPTATION DE LA PREUVE D'EFFICACITÉ D'UN SYSTÈME CLHP/CLUP-SPECTROPHOTOMÉTRIE POUR LA MESURE DU FORMAZAN EXTRAIT D'UN MODÈLE TISSULAIRE D'EChR

Paramètre	Protocole dérivé des recommandations de la FDA (36)(38)	Critères d'acceptation
Sélectivité	Analyse de l'isopropanol, du blanc vivant (extrait de modèle tissulaire d'EChR vivant sans traitement dans l'isopropanol), blanc tué (extrait de modèle tissulaire d'EChR tué sans traitement dans l'isopropanol), et d'un colorant (bleu de méthylène, par exemple)	$\text{Surface}_{\text{interférence}} \leq 20 \% \text{ Surface}_{\text{VLIQ}}^1$
Fidélité	Contrôles de qualité (c'est-à-dire, bleu de formazan à 1,6 µg/ml, 16 µg/ml et 160 µg/ml) dans l'isopropanol (n=5)	$\text{CV} \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ pour la VLIQ}$
Justesse	Contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	$\% \text{ Écart} \leq 15\% \text{ ou } \leq 20\% \text{ pour la VLIQ}$
Effet de matrice	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=5)	Effet de matrice compris entre 85 % et 115 %
Effet résiduel	Analyse de l'isopropanol après une VLSQ2 normale	$\text{Surface}_{\text{interférence}} \leq 20 \% \text{ Surface}_{\text{VLIQ}}$
Répétabilité (même jour)	3 courbes d'étalonnage indépendantes (établies sur la base de 6 dilutions de formazan au 1/3 consécutives dans l'isopropanol, avec point de départ VLSQ, soit 200 µg/ml); contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=5)	Courbes d'étalonnage: $\% \text{ Écart} \leq 15 \% \text{ ou } \leq 20 \% \text{ pour la VLIQ}$ Contrôles de qualité: $\% \text{ Écart} \leq 15 \% \text{ et } \text{CV} \leq 15 \%$
Reproductibilité (d'un jour à l'autre)	Jour 1: 1 courbe d'étalonnage et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3)	
	Jour 2: 1 courbe d'étalonnage et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3) Jour 3: 1 courbe d'étalonnage et contrôles de qualité dans l'isopropanol (n=3)	
Stabilité à court terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysé le jour de la préparation et après une conservation de 24 heures à température ambiante	$\% \text{ Écart} \leq 15 \%$
Stabilité à long terme du formazan dans un extrait tissulaire d'EChR, si nécessaire	Contrôles de qualité dans le blanc vivant (n=3) analysé le jour de la préparation et après une conservation de plusieurs jours à -20°C	$\% \text{ Écart} \leq 15 \%$

¹ VLIQ: valeur limite inférieure de quantification, définie comme correspondant à une viabilité tissulaire de 1-2 %, soit 0,8 µg/ml.

² VLSQ: valeur limite supérieure de quantification, définie comme au moins deux fois la concentration maximale attendue de formazan dans les extraits d'isopropanol issus des témoins négatifs (~70 µg/ml selon la MRV), soit 200 µg/ml.

B.70 ESSAIS IN VITRO FAISANT APPEL AU RÉCEPTEUR D'ŒSTROGÈNE RECOMBINANT HUMAIN (HRER) POUR LA DÉTECTION DES PRODUITS CHIMIQUES AYANT UNE AFFINITÉ DE LIAISON AVEC LES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Ligne directrice d'essai de l'OCDE axée sur la performance

1. La présente méthode d'essai est équivalente à la ligne directrice 493 (2015) de l'OCDE. La ligne directrice 493 pour les essais de produits chimiques est axée sur la performance (LDAP) et décrit la méthodologie des essais *in vitro* faisant appel au récepteur d'œstrogène recombinant humain pour la détection des substances ayant une affinité de liaison avec les récepteurs des œstrogènes (essais de liaison au hrER). Elle comprend deux essais structurellement et fonctionnellement similaires pour détecter les ligands des récepteurs des œstrogènes (ER α), et doit faciliter l'élaboration de nouveaux essais similaires ou modifiés, 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 de référence totalement validées (appendices 2 et 3) qui sont à la base de la présente méthode d'essai axée sur la performance sont les suivantes:
 - Essai de Freyberger-Wilson (FW): essai *in vitro* de liaison aux récepteurs des œstrogènes (ER) à l'aide d'un ER α humain intégral (2), et
 - Essai du Chemical Evaluation and Research Institute (CERI): essai *in vitro* de liaison aux récepteurs des œstrogènes à l'aide du domaine de liaison du ligand d'un ER recombinant humain (2).

Des normes de performance (3) sont disponibles afin de faciliter l'élaboration et la validation d'essais similaires visant le même paramètre de sécurité, et elles permettent de modifier la ligne directrice 493 en temps utile par l'ajout de nouveaux essais similaires. L'ajout de tels nouveaux essais similaires n'est toutefois possible qu'après examen et vérification, par l'OCDE, du respect des normes de performance. Chacun des essais inclus dans la ligne directrice 493 peut être utilisé pour répondre aux exigences des pays membres de l'OCDE en matière d'essai de liaison aux ER, dans le cadre du système d'acceptation mutuelle de données de l'OCDE.

Contexte et principes des essais inclus dans la présente méthode d'essai

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 pour la détection 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 (4). Le CC comprend cinq niveaux, chacun d'entre eux correspondant à un degré différent de complexité biologique. Les essais de liaison aux ER décrits dans cette méthode d'essai 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 méthode d'essai vise les essais in vitro de liaison aux récepteurs conçus pour détecter les ligands du récepteur des œstrogènes alpha (ER α) chez l'humain.

3. La pertinence de l'essai de liaison aux ER *in vitro* à l'égard des fonctions biologiques a été clairement démontrée. Les essais de liaison aux ER sont conçus pour détecter les produits chimiques susceptibles de perturber les voies d'activité liées à l'hormone œstrogène. Cela fait vingt ans qu'ils sont largement utilisés pour caractériser la distribution tissulaire des ER et pour déterminer les agonistes et les antagonistes de ces récepteurs. Ces essais reposent sur l'interaction ligand-récepteur, qui constitue la première étape de la voie de signalisation des œstrogènes, essentielle aux fonctions reproductives chez l'ensemble des vertébrés.
4. L'interaction des œstrogènes et des ER peut affecter la transcription des gènes régulés par les œstrogènes et avoir des conséquences au-delà du génome en entraînant 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 (5) (6) (7). La perturbation des systèmes œstrogéniques normaux pourrait déclencher des troubles du développement (ontogenèse) et nuire à la santé génésique et à l'intégrité du système reproductif. Une mauvaise signalisation des ER peut notamment se traduire par un risque accru de cancer hormonodépendant, des troubles de la fertilité ainsi que des altérations de la croissance et du développement du fœtus (8).
5. Les essais de liaison *in vitro* reposent sur l'interaction directe entre une substance et le domaine de liaison du ligand spécifique d'un récepteur qui régule la transcription d'un gène. L'essai de liaison au récepteur des œstrogènes alpha recombinant humain (hrER α) consiste principalement à mesurer la capacité d'un ligand radiomarqué (le [^{3} H]-17 β -œstradiol) à se lier aux ER en présence de concentrations croissantes du produit chimique d'essai (appelé «compétiteur»). Les produits chimiques d'essai qui présentent une forte affinité de liaison avec les ER entrent en concurrence avec le ligand radiomarqué à une concentration plus faible que les composés ayant une affinité moindre vis-à-vis du récepteur. L'essai comporte deux grands éléments: une expérience de liaison à saturation pour établir les paramètres de l'interaction récepteur-ligand et documenter la spécificité des liaisons aux ER, puis une expérience de liaison compétitive visant à déterminer dans quelle mesure un produit chimique d'essai fait concurrence à un ligand radiomarqué pour se fixer aux ER.

6. Les études de validation des méthodes de liaison du CERI et de FW ont démontré la pertinence et la fiabilité de ces essais aux fins prévues (2).
7. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont présentées à l'appendice 1.

Portée et limites des essais de liaison aux récepteurs

8. Ces essais sont proposés à des fins de détection et de priorisation, mais ils peuvent aussi livrer des informations sur l'événement d'initiation moléculaire (EIM) utiles dans le cadre d'une approche fondée sur le poids de la preuve. Ils s'appuient sur l'établissement d'une liaison chimique avec le domaine de liaison du ligand des ER α dans un système in vitro. Aussi les résultats obtenus ne doivent-ils pas être directement extrapolés aux mécanismes complexes de signalisation et de régulation qui caractérisent un système endocrinien intact in vivo.
9. La liaison du ligand naturel 17 β -œstradiol aux ER est la première étape d'une série d'événements moléculaires qui activent la transcription des gènes cibles, et se traduisent in fine par un changement physiologique (9). Cet amarrage au domaine de liaison du ligand des ER α est donc considéré comme l'un des mécanismes clés de la perturbation endocrinienne (PE) médiée par les ER, bien que la PE puisse procéder par d'autres mécanismes, notamment: (i) des interactions avec des parties des ER α autres que le site de liaison du ligand, (ii) des interactions avec d'autres récepteurs jouant sur la signalisation des œstrogènes, les ER β et les ER couplés aux protéines G ainsi que d'autres récepteurs et systèmes enzymatiques du système endocrinien, (iii) la synthèse hormonale, (iv) l'activation et/ou l'inactivation métaboliques des hormones, (v) la distribution des hormones dans les tissus cibles, et (vi) l'élimination des hormones de l'organisme. Aucun des essais visés par la présente méthode d'essai ne porte sur ces modes d'action.
10. La présente méthode d'essai repose sur la capacité de substances à se lier aux ER α humains, et n'opère pas de distinction entre les agonistes et les antagonistes des ER α . Ces essais n'abordent pas non plus les événements déclenchés par cette liaison, comme la transcription des gènes ou les changements physiologiques. Étant donné que l'étude de validation n'a porté que sur des substances mono-constituant, il n'existe aucune information quant à l'applicabilité de l'essai aux mélanges. Cela étant, ces essais demeurent théoriquement applicables à l'évaluation de mélanges ou de substances multi-constituants. Avant de mettre en œuvre la présente méthode d'essai sur un mélange afin de dégager des données à des fins réglementaires, il convient d'examiner si, et le cas échéant pourquoi, ladite méthode peut fournir des résultats adéquats aux fins visées. Ces questions ne se posent pas quand la réglementation exige de réaliser l'essai sur le mélange.
11. Les systèmes de récepteurs hors cellule n'ont intrinsèquement aucune compétence métabolique et n'ont pas été validés en combinaison avec des systèmes enzymatiques

métaboliques. Il serait toutefois possible d'intégrer l'activité métabolique dans la conception de l'étude, sous réserve de nouveaux travaux de validation.

12. Concernant les produits chimiques susceptibles de dénaturer les protéines (telles que celles qui constituent le récepteur), comme les tensioactifs, ou les produits chimiques modifiant le pH de la solution d'essai tamponnée, l'essai peut ne pas convenir, ou bien à des concentrations d'essai auxquelles ces interactions n'apparaissent pas. Dans les autres cas, la fourchette de concentrations d'essai d'un produit chimique est plafonnée par sa solubilité dans la solution d'essai tamponnée.
13. À titre d'information, le tableau 1 fournit les résultats des essais des 24 substances testées avec les deux essais totalement validés décrits dans la présente méthode d'essai. Parmi ces substances, 17 sont classées comme ligands des ER et 6 comme non-ligands d'après les rapports publiés, notamment sur les essais *in vitro* d'activation transcriptionnelle et/ou les essais utéro-trophiques (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). S'agissant des données résumées dans le tableau 1, les deux essais ont presque abouti aux mêmes conclusions pour l'ensemble des substances jusqu'à 10^{-4} M, et chaque composé a été classé correctement comme ligand ou non-ligand des ER. D'autres renseignements sur ce groupe de produits chimiques ainsi que sur les substances supplémentaires testées dans les essais de liaison aux ER dans le cadre des études de validation sont fournis dans les normes de performance pour les essais de liaison au hrER (3) à l'appendice 2 (tableaux 1, 2 et 3).

Tableau 1: Classification des substances comme ligand ou non-ligand des ER à l'issue d'essais de liaison au hrER d'après les méthodes de FW et du CERI, et comparaison avec la réponse attendue

	Nom de la substance	N° CAS	Réponse attendue	Essai FW		Essai CERI		Classe chimique dans le système MeSH Classe	Classe du produit
				Fourchette de concentrations (M)	Classification	Fourchette de concentrations (M)	Classification		
1	17β-œstradiol (E2)	50-28-2	Ligand	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Ligand	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Ligand	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
2	Noréthynodrel	68-23-5	Ligand	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Ligand	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Ligand	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
3	Noréthindrone	68-22-4	Ligand	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Ligand	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Ligand	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
4	Phtalate de dibutyle	84-74-2	Non-ligand*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Non-ligand**†	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Non-ligand**†	Hydrocarbure (cyclique), ester	Plastifiant, intermédiaire chimique
5	DES	56-53-1	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
6	17α-éthynylestradiol	57-63-6	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
7	méso-hexestrol	84-16-2	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
8	Génistéine	446-72-0	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Hydrocarbure (hétérocyclique), flavonoïde	Produit naturel
9	Équol	531-95-3	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Métabolite des phytoestrogènes	Produit naturel
10	Butylparabène (n-butyl-4-hydroxybenzoate)	94-26-8	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Paraben	Conservateur
11	Nonylphénol (mélange)	84852-15-3	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Alkylphénol	Composé intermédiaire
12	o,p'-DDT	789-02-6	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Organochlorine	Insecticide
13	Corticostérone	50-22-6	Non-	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Non-ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Non-ligand	Stéroïde	Produit naturel
14	Zéaralénone	17924-92-4	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Hydrocarbure (hétérocyclique), lactone	Produit naturel
15	Tamoxifène	10540-29-1	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique et vétérinaire
16	5α-dihydrotestostérone	521-18-6	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Stéroïde, non phénolique	Produit naturel
17	Bisphénol A	80-05-7	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Phénol	Intermédiaire chimique

18	4- <i>n</i> -heptylphénol	1987-50-4	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Équivoque ^a	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Alkylphénol	Intermédiaire
19	Képone (chlordécone)	143-50-0	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Hydrocarbure (halogéné)	Pesticide
20	Benz(a)anthracène	56-55-3	Non-ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Non-ligand ^b	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Non-ligand ^b	Hydrocarbure aromatique	Intermédiaire
21	Entérolactone	78473-71-9	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Ligand	Phytoestrogène	Produit naturel
22	Progestérone	57-83-0	Non-ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Non-ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Non-ligand	Stéroïde	Produit naturel
23	Octyltriéthoxysilane	2943-75-1	Non-ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Non-ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Non-ligand	Silane	Modificateur de surface
24	Atrazine	1912-24-9	Non-ligand*	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Non-ligand	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Non-ligand	Composé hétérocyclique	Herbicide

* Limite de solubilité $< 1 \times 10^{-4}$ M.

* L'utilisation et la classification du phtalate de dibutyle (DBP) en tant que non-ligand reposent sur un essai de concentrations allant jusqu'à 10^{-4} M, car au cours des études de prévalidation, certains laboratoires ont observé que la substance était insoluble à 10^{-3} M (p.ex. apparition d'un trouble).

† Pendant l'étude de validation, le phtalate de dibutyle (DBP) a fait office de substance d'essai codée à des concentrations allant jusqu'à 10^{-3} M. Dans ces conditions, certains laboratoires ont observé une baisse des liaisons du ligand radiomarké à la concentration maximale (10^{-3} M) et/ou un ajustement de la courbe incertain. Ces essais ont abouti à la classification du DBP comme «équivoque» ou «ligand» dans les 3/5 des laboratoires utilisant la méthode du CERI et dans les 5/6 des laboratoires appliquant la méthode de FW (voir référence (2), sections IV.B.3a,b et VI.A).

a La classification obtenue n'est pas celle qui était attendue. La classification du 4-*n*-heptylphénol comme «équivoque» ou «non-ligand» par les 3/5 des laboratoires a donné lieu en moyenne à une classification en tant qu'équivoque. À y regarder de plus près, il s'avère que ce résultat s'explique par des limites de solubilité chimique qui n'ont pas permis de produire une courbe de liaison complète.

b Pendant l'étude de validation, le benz(a)anthracène a été reclassé comme non-ligand (c'est-à-dire négatif) d'après des publications démontrant que l'activité œstrogénique in vitro signalée pour cette substance (16) dépend principalement de son activation métabolique (17) (18). Il ne devrait pas y avoir d'activation métabolique enzymatique de cette substance dans les essais de liaison au hrER hors cellule comme ceux de l'étude de validation interlaboratoires. Ainsi, la classification correcte de cette substance est «non-ligand» lorsqu'elle est utilisée dans les conditions expérimentales des essais de FW et du CERI.

ÉLÉMENTS DE LESSAI DE LIAISON AU hrER

Éléments essentiels de l'essai

14. La présente méthode d'essai concerne les essais faisant appel à un récepteur des œstrogènes et à un ligand de ce récepteur qui présente une affinité de liaison suffisamment forte. Ce ligand doit servir de marqueur ou traceur de l'essai et être remplacé par le produit chimique d'essai quand la concentration de celui-ci augmente. Les essais de liaison se composent des deux grands éléments suivants: 1) liaison à saturation et 2) liaison compétitive. L'essai de liaison à saturation sert à confirmer la spécificité et l'activité des préparations de récepteurs, tandis que l'essai de liaison compétitive permet d'évaluer la capacité du produit chimique d'essai à se lier au hrER.

Témoins

15. Il convient de détailler pourquoi les témoins et la substance œstrogénique de référence concomitants ont été choisis. L'essai de liaison compétitive requiert, le cas échéant, un témoin avec solvant (véhicule), un témoin positif (ligand des ER; affinité forte et faible) et un témoin négatif (non-ligand). Ces témoins attestent du bon fonctionnement de l'essai dans les conditions de l'essai et fournissent des éléments de comparaison d'une expérience à l'autre; ils font généralement partie des critères d'acceptabilité d'une expérience donnée (1). Pour chaque essai, une même plaque sert à établir les courbes pour toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins (ligand faible et non-ligand). Toutes les autres plaques doivent contenir: 1) une concentration élevée (remplaçant presque entièrement le ligand radiomarké) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI50) d'E2 et du ligand faible, en triple exemplaire; 2) des témoins avec solvant et des ligands non spécifiques, chacun en triple exemplaire.

Procédures standard de contrôle de qualité

16. Il convient de suivre les procédures standard de contrôle de qualité décrites pour chaque essai afin de garantir que les récepteurs sont actifs, que les concentrations chimiques sont correctes, que l'intervalle de tolérance reste stable au fil des multiples répliques de l'essai, et que l'essai permet toujours d'établir les liaisons aux ER attendues au fil du temps.

Démonstration des compétences du laboratoire

17. Avant de soumettre des produits chimiques inconnus à l'un des essais relevant de la présente méthode d'essai, chaque laboratoire devra démontrer qu'il peut le mettre en œuvre en effectuant des essais à saturation pour confirmer la spécificité et l'activité de la préparation de récepteurs ainsi que des essais de liaison compétitive avec la substance œstrogénique de référence et les témoins (ligand faible et non-ligand). Chaque laboratoire doit ainsi créer une base de données compilant les résultats obtenus pour la substance œstrogénique de référence et les témoins à l'issue de 3 à 5 expériences indépendantes qui ne sont pas réalisées le même jour. Ces expériences constituent un fondement historique pour le laboratoire concernant les témoins et la substance œstrogénique de référence, et permettent d'évaluer partiellement l'acceptabilité des futurs essais.
18. La réactivité du système d'essai sera également confirmée en testant les substances d'épreuve de compétence énumérées dans le tableau 2. 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 liaison aux ER (3). Ces substances sont disponibles dans le commerce, représentent les classes de produits chimiques auxquelles on prête généralement une affinité de liaison aux ER, et manifestent une gamme d'activité correspondant aux affinités attendues pour la liaison aux ER (de faible à forte) ou encore une absence de liaison (négatifs). Pour chaque substance d'épreuve de compétence, les concentrations analysées doivent couvrir la fourchette indiquée dans le tableau 2. Il faut réaliser au moins trois expériences pour chaque substance, dont les résultats doivent correspondre à l'activité chimique attendue. Chaque expérience est réalisée indépendamment

en utilisant de nouvelles dilutions du récepteur, des produits chimiques et du réactif, avec trois réplicats par concentration. La compétence est démontrée lorsque chaque substance d'épreuve de compétence est correctement classée (réponse positive/négative). L'épreuve de compétence est effectuée par chaque technicien dans le cadre de la formation aux essais.

Tableau 2: Liste des témoins et des substances d'épreuve de compétence pour les essais de liaison compétitive au hrER¹

N°	Nom de la substance	N° CAS ²	Réponse attendue ^{3,4}	Fourchette de concentrations de l'essai(M)	Classe chimique dans le système MeSH ⁵	Type de produit ⁶
Controls (Reference estrogen, weak binder, non-binder)						
1	17β-estradiol	50-28-2	Ligand	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
2	Noréthynodrel (or) Noréthindrone	68-23-5 (or) 68-22-4	Ligand	3x10 ⁻⁹ – 30x10 ⁻⁶	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
3	Octyltriéthoxysilane	2943-75-1	Non-ligand	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Silane	Modificateur de surface
Substances d'épreuve de compétence⁶						
4	Diéthylstilbestrol	56-53-1	Ligand	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
5	17α-éthynylestradiol	57-63-6	Ligand	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
6	méso-Hexestrol	84-16-2	Ligand	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
7	Tamoxifène	10540-29-1	Ligand	1x10 ⁻¹¹ – 1x10 ⁻⁶	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique et vétérinaire
8	Génistéine	446-72-0	Ligand	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Composé hétérocyclique, flavonoïde	Produit naturel
9	Bisphénol A	80-05-7	Ligand	1x10 ⁻¹⁰ – 1x10 ⁻³	Phénol	Intermédiaire chimique

10	Zéaralonone	17924-92-4	Ligand	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Composé hétérocyclique, lactone	Produit naturel
11	Butylparabène	94-26-8	Ligand	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Acide carboxylique, phénol	Conservateur
at	Atrazine	1912-24-9	Non-ligand	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Composé hétérocyclique	Herbicide
13	Phthalate de dibutyle (DBP) ⁷	84-74-2	Non-ligand ⁸	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Hydrocarbure (cyclique), ester	Plastifiant, intermédiaire chimique
14	Corticostérone	50-22-6	Non-ligand	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Stéroïde	Produit naturel

¹ Si une substance d'épreuve de compétence n'est plus commercialement disponible, on peut utiliser une substance ayant la même classification en termes de liaison aux ER ainsi qu'une affinité et une classe chimique comparables.

² Abréviation: No CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service.

³ Classification comme ligand ou non-ligand des ER α établie à l'issue de l'étude de validation des essais de liaison au hrER du CERI et de FW (2).

⁴ L'affinité de liaison aux ER a été établie à partir des Background Review Documents (BRD) de l'ICCVAM relatifs aux essais de liaison aux ER et de TA ER (9) ainsi que des données empiriques et d'autres données tirées des publications parues et examinées (10) (11) (12) (13) (14) (15).

⁵ 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>).

⁶ Les substances ont été placées dans une ou plusieurs classes 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>).

⁷ Le DPB peut également faire office de témoin non ligand, mais à une concentration maximale de 10^{-4} M.

⁸ La limite de solubilité de cette substance est 10^{-4} M. L'utilisation et la classification du phthalate de dibutyle (DBP) en tant que non-ligand reposent sur un essai à des concentrations allant jusqu'à 10^{-4} M, car au cours des études de prévalidation, certains laboratoires ont observé que la substance était insoluble à 10^{-3} M (p.ex. apparition d'un trouble).

Détermination de la solubilité et de l'ordre de grandeur des concentrations des produits chimiques d'essai

19. Un essai préliminaire est nécessaire pour déterminer la limite de solubilité de chaque produit chimique d'essai ainsi que la fourchette de concentrations qui convient pour l'essai. La limite de solubilité de chaque produit chimique d'essai doit d'abord être déterminée dans le solvant, puis confirmée dans les conditions de l'essai. La concentration finale utilisée dans l'essai ne doit pas dépasser 1 mM. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur s'effectue à l'aide d'un témoin avec solvant et d'une série logarithmique de huit dilutions de la concentration maximale acceptable (p.ex. 1 mM ou moins, selon la limite de solubilité). On relèvera l'apparition d'un trouble ou d'un précipité, le cas échéant. Il faut ajuster les concentrations des deuxième et troisième expériences de façon à mieux caractériser la courbe concentration-réponse.

Critères d'acceptabilité de l'essai

20. L'acceptation ou le rejet d'un essai dépend de l'évaluation des résultats obtenus avec la substance œstrogénique de référence et les témoins utilisés pour chaque expérience. Il faut d'abord que pour la première plaque, les courbes concentration-réponse complètes obtenues pour les substances de référence de chaque expérience correspondent aux mesures de la performance fondées sur les paramètres d'ajustement des courbes (p.ex. CI50 et pente de Hill) découlant des résultats des méthodes d'essai du CERI et du FW, respectivement (appendices 2 et 3), et des données historiques concernant les témoins dont dispose le laboratoire qui réalise l'essai. Tous les témoins (substance œstrogénique de référence, ligand faible et non-ligand) doivent être classés correctement à l'issue de chaque expérience. Ensuite, les témoins de toutes les plaques suivantes doivent livrer des résultats concordants avec ceux de la première plaque. Il convient d'analyser une fourchette de concentrations du produit chimique d'essai suffisante pour définir clairement le sommet de la courbe de liaison compétitive. La variabilité entre les réplicats de chaque concentration du produit chimique d'essai et entre les trois essais indépendants doit rester raisonnable et défendable sur le plan scientifique. Un laboratoire prouve sa compétence à répéter l'essai de manière homogène en établissant et en entretenant une base de données compilant les résultats historiques pour la substance œstrogénique de référence et les témoins. Les écarts-types (ET) ou coefficients de variation (CV) des moyennes des paramètres d'ajustement des courbes de la substance œstrogénique de référence et du ligand faible témoin obtenues après plusieurs expériences peuvent servir à mesurer la reproductibilité intra-laboratoire. Un avis professionnel s'impose pour analyser les résultats des témoins de la plaque pour chaque essai et pour chaque produit chimique d'essai.

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

- Les données doivent être suffisantes pour évaluer quantitativement la liaison aux ER

- Les concentrations testées doivent rester inférieures à la limite de solubilité du produit chimique d'essai.

Analyse des données

21. La procédure d'analyse définie pour les résultats des essais de liaison à saturation et de liaison compétitive doit être conforme aux principes fondamentaux de caractérisation des interactions ligand-récepteur. Les données de liaison à saturation sont généralement analysées en appliquant un modèle de régression non linéaire fondé sur les liaisons totale et non spécifique. Il peut s'avérer nécessaire d'effectuer une correction du fait de la perte de ligand (p.ex. Swillens, 1995(19)) pour déterminer la capacité maximale de liaison B_{max} et la constante de liaison K_d . Dans les essais de liaison compétitive, les données sont typiquement transformées (p.ex. pourcentage de liaison spécifique, logarithme de la concentration de produit chimique d'essai). Les $\log(CI_{50})$ de chaque produit chimique d'essai sont estimés grâce à un logiciel d'ajustement des courbes par régression non linéaire approprié se fondant sur une équation de Hill à quatre paramètres. Après une première analyse, les paramètres d'ajustement des courbes sont déterminés, puis on vérifie visuellement si les données de liaison correspondent à la courbe de liaison compétitive obtenue. Une analyse supplémentaire est parfois nécessaire en vue d'obtenir un ajustement des courbes optimal, par exemple en resserrant le sommet et la base de la courbe ou en appliquant la règle des 10 % (voir appendice 4 et référence 2, Section III.A.2).
22. Le respect des critères d'acceptabilité (paragraphe 20) indique que le système d'essai fonctionne correctement, mais ne garantit pas que chaque essai lancé fournira des données exactes. La réplication des résultats corrects du premier essai constitue la meilleure indication que les valeurs obtenues sont exactes.

Critères généraux d'interprétation des données

23. Il n'existe actuellement aucune méthode d'interprétation des données d'essai de liaison aux ER universellement reconnue. Cependant, les évaluations qualitatives (p.ex. ligand ou non-ligand) et/ou quantitatives (p.ex. CI_{50} , affinité de liaison relative [ALR]) de l'activité médiée par les hrER doivent s'appuyer sur des données empiriques et des raisonnements scientifiques solides.

Rapport d'essai

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

Essai:

- Essai employé;

Témoins/substance 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, UVBC 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;

Récepteurs:

- source des récepteurs (fournisseur, numéro de référence, lot, type de récepteur, concentration de récepteurs actifs indiquée par le fournisseur, certification du fournisseur)
- caractérisation des récepteurs (y compris les résultats des essais de liaison à saturation): K_d , B_{max} ,
- stockage des récepteurs
- ligand radiomarqué:
- fournisseur, numéro de référence, lot, activité spécifique

Conditions de l'essai:

- limites de solubilité dans les conditions de l'essai;
- composition de la solution tamponnée de l'essai de liaison;
- concentration de récepteur;
- concentration de traceur (ligand radiomarqué);
- concentrations de produit chimique d'essai;

- pourcentage de véhicule dans l'essai final;
- température et durée d'incubation;
- méthode de séparation des ligands liés et libres;
- témoins et produits chimiques positifs et négatifs de référence;
- critères d'interprétation des résultats positif, négatif ou équivoque;

Vérification de l'acceptabilité:

- valeurs réelles des CI_{50} et pentes de Hill pour les témoins positifs et produits chimiques de référence inclus dans l'essai de liaison compétitive;

Résultats:

- données brutes, données sur les ligands liés ou libres;
- vérification de la dénaturation, s'il y a lieu;
- concentration minimale avec effet (CME), le cas échéant;
- ALR et/ou CI_{50} , le cas échéant;
- relation concentration-réponse, si possible;
- analyses statistiques, le cas échéant, ainsi qu'une mesure de l'erreur et de la confiance (p.ex. 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:

- application de la règle des 10 %.

Conclusion

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (N° 34), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (2) OCDE (2015). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (3) OCDE (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (4) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p.20-6.
- (6) 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.
- (7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): p. 63-6.
- (8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293-342.
- (9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- (10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

- (12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.
- (13) OCDE (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- (14) Takeyoshi, M. (2006). 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, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.
- (15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111-120.
- (16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213-221.
- (17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58-67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835-848.
- (19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

Appendice 1

DÉFINITIONS ET ABRÉVIATIONS

Règle des 10 %: possibilité d'exclure des points de données des analyses lorsque le pourcentage de liaison spécifique moyen du [^3H]-17 β -œstradiol pour tous les réplicats d'une concentration dépasse de 10 % ou plus la moyenne correspondant à une concentration inférieure (voir appendice 4).

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

Précision (concordance): degré de conformité entre les résultats de l'essais et les valeurs de référence acceptées. Elle constitue une mesure de performance de l'essai et l'un des aspects de sa pertinence. Ce terme et celui de «concordance» sont souvent utilisés indifféremment pour qualifier la proportion de résultats corrects d'un essai (1).

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

Produit chimique: une substance ou un mélange.

CV: coefficient de variation

E2: 17 β -estradiol

PE: perturbation endocrinienne

hER α : récepteur des œstrogènes alpha humain

ER: *estrogen receptor* (récepteur des œstrogènes)

Activité œstrogénique: capacité d'un produit chimique à reproduire la capacité du 17 β -œstradiol à se fixer aux récepteurs des œstrogènes. La présente méthode d'essai permet de détecter les liaisons au hER α .

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

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

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 de qualité et de quantité. La reproductibilité inter-laboratoires est déterminée au cours des processus de prévalidation 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).

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 le nombre d'inductions est statistiquement différent de celui du témoin avec véhicule concomitant).

Réplique d'essai: méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Synonyme de méthode d'essai similaire

LDAP: Ligne directrice pour les essais axée sur la performance

Normes de performance: normes, fondées sur une méthode d'essai validée, permettant d'évaluer la comparabilité d'un essai proposé structurellement et fonctionnellement similaire. Elles comprennent: (1) les éléments essentiels de l'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 l'essai proposé doit présenter lorsqu'on l'évalue à l'aide des produits chimiques de référence de la liste minimale (1).

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 un essai normalisé. 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.

Compétence: capacité à conduire correctement un essai, démontrée avant de tester des substances inconnues.

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

Méthodes d'essai de référence: les essais sur lesquels se fonde la ligne directrice 493.

ALR: affinité de liaison relative. L'ALR d'une substance est exprimée en pourcentage à partir du rapport entre le log(CI₅₀) de la substance et le log(CI₅₀) du 17 β -œstradiol

Pertinence: description de la relation entre un 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'un essai (1).

Fiabilité: mesure dans laquelle la mise en œuvre d'un 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.

ET: écart-type.

Produit chimique d'essai: toute substance ou tout mélange soumis à un essai réalisé suivant la

présente méthode d'essai.

Méthode d'essai validée: 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).

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

Appendice 2

PROTOCOLE DE FREYBERGER ET WILSON RELATIF AUX ESSAIS IN VITRO DE LIAISON À SATURATION ET DE LIAISON COMPÉTITIVE AUX RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES (ER α) FAISANT APPEL À UN ER α RECOMBINANT INTÉGRAL

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES (VOIR AUSSI INTRODUCTION GÉNÉRALE)

1. Cet essai *in vitro* de liaison à saturation et de liaison compétitive aux récepteurs des œstrogènes (ER α) fait appel au récepteur des œstrogènes alpha humain intégral (hrER α) produit et isolé à partir de cellules d'insectes infectées à l'aide d'un baculovirus. Le protocole mis au point par Freyberger et Wilson a fait l'objet d'une étude de validation internationale réalisée par plusieurs laboratoires (2). Cette étude a démontré la pertinence et la fiabilité de cet essai aux fins prévues.
2. Le présent essai constitue une procédure de criblage visant à détecter les substances qui peuvent se lier au hrER α intégral. Elle permet de déterminer la capacité d'un produit chimique d'essai à former les liaisons avec le hrER α en concurrence avec le 17 β -œstradiol. Sur le plan quantitatif, l'essai peut livrer les résultats suivants: la CI₅₀, c'est-à-dire la concentration de produit chimique d'essai nécessaire pour remplacer la moitié du [³H]-17 β -œstradiol lié au hrER α , et les affinités de liaison relatives (ALR) vis-à-vis du hrER α des produits chimiques d'essai par rapport au 17 β -œstradiol. L'essai visant à trier les produits chimiques, les résultats acceptables sur le plan qualitatif sont la classification des produits chimiques d'essai soit comme ligands, soit comme non-ligands du hrER α , ou comme produits induisant une réponse équivoque, en fonction de critères définis à partir des courbes de liaison.
3. Étant donné que l'essai fait appel à un ligand radiomarké, le laboratoire doit disposer d'une autorisation de manipuler des matériaux radioactifs. Toutes les procédures qui impliquent des isotopes radioactifs ou des produits chimiques dangereux doivent être conformes aux réglementations et aux procédures établies par la législation nationale.
4. Il convient de lire les parties «**INTRODUCTION GÉNÉRALE**» et «**ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE LIAISON AU hrER**» avant de mettre en œuvre le présent essai à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans la présente méthode d'essai sont indiquées à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI (VOIR AUSSI INTRODUCTION GÉNÉRALE

5. L'essai de liaison au hrER α repose principalement sur la mesure de la capacité d'un ligand radiomarké ([³H]-17 β -œstradiol) à se lier aux ER en présence de concentrations croissantes d'un produit chimique d'essai (appelé «compétiteur»). Les produits chimiques

d'essai qui présentent une forte affinité de liaison avec les ER entrent en concurrence avec le ligand radiomarké à une concentration plus faible que les composés ayant une affinité moindre vis-à-vis du récepteur.

6. L'essai comporte deux grands éléments: une expérience de liaison à saturation pour établir les paramètres de l'interaction récepteur-ligand, puis une expérience de liaison compétitive visant à déterminer dans quelle mesure un produit chimique d'essai fait concurrence à un ligand radiomarké pour se lier aux ER.
7. L'objectif de l'expérience de liaison à saturation est de caractériser le nombre et l'affinité de liaison des récepteurs dans un lot donné, dans la perspective de l'essai de liaison compétitive. L'expérience de liaison à saturation permet de mesurer, à l'équilibre, l'affinité d'une concentration fixe de récepteurs des œstrogènes vis-à-vis de leur ligand naturel (représentée par la constante de dissociation K_d), ainsi que la concentration de sites récepteurs actifs (B_{max}).
8. L'expérience de liaison compétitive détermine l'affinité d'une substance à se lier aux ER en concurrence avec le [^3H]-17 β -œstradiol. Cette affinité est quantifiée par la concentration de produit chimique d'essai qui, à l'équilibre, inhibe 50 % des liaisons spécifiques du [^3H]-17 β -œstradiol, appelée «concentration induisant 50 % d'inhibition» ou CI_{50}). Elle peut aussi s'exprimer par l'affinité de liaison relative (ALR, calculée par rapport à la CI_{50} de l'œstradiol mesurée séparément lors du même essai). L'expérience de liaison compétitive mesure la liaison aux ER du [^3H]-17 β -œstradiol en concentration fixe en présence d'une large fourchette (huit ordres de grandeur) de concentrations du produit chimique d'essai. Les données sont ensuite ajustées, quand c'est possible, à une forme de l'équation de Hill (Hill, 1910) décrivant le remplacement du ligand radiomarké par un compétiteur sur un site unique. L'ampleur du remplacement du ligand radiomarké œstradiol à l'équilibre permet alors de caractériser le produit chimique d'essai comme ligand, non-ligand ou produit induisant une réponse équivoque.

MODE OPÉRATOIRE

Démonstration de l'acceptabilité de la performance de la protéine hrER α

9. Avant d'effectuer de manière routinière les essais de liaison à saturation et de liaison compétitive, il faut vérifier que chaque nouveau lot de hrER α fonctionne correctement dans le laboratoire où il doit être utilisé. Cette démonstration de la performance repose sur un processus en deux étapes:
 - Essai de liaison à saturation avec du [^3H]-17 β -œstradiol pour démontrer la saturation et la spécificité vis-à-vis du hrER α . Une analyse de régression non linéaire des données obtenues (p.ex. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) permettant d'obtenir une représentation de Scatchard, livrera l'affinité de liaison au hrER α du [^3H]-17 β -œstradiol (K_d) ainsi que le nombre de récepteurs actifs (B_{max}), pour chaque lot de hrER α .

- Essai de liaison compétitive avec les substances témoins (substance œstrogénique de référence [17β -œstradiol], ligand faible [noréthynodrel ou noréthindrone] et non-ligand [octyltriéthoxysilane, OTES]). Chaque laboratoire est tenu de créer une base de données historiques visant à documenter que la CI_{50} et d'autres valeurs pertinentes relatives à la substance œstrogénique de référence et au ligand faible restent cohérentes d'une expérience à l'autre et d'un lot de hrER α à l'autre. Il faut que les paramètres des courbes de liaison compétitive obtenus pour les substances témoins demeurent dans les limites de l'intervalle de confiance à 95 % (voir tableau 1) déterminées grâce aux données des laboratoires participant à l'étude de validation de l'essai (2).

Tableau 1. Critères de performance établis pour la substance œstrogénique de référence et le ligand faible dans l’essai de liaison au hrER de FW.

Substance	Paramètre	Moyenne ^a	Écart-type (n)	Intervalle de confiance à 95 % ^b	
				Limite minimale	Limite maximale
17β-œstradiol	Sommet (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Base (%)	0,29	1,25 (67)	−0,01	0,60
	Pente de Hill	−1,06	0,20 (67)	−1,11	−1,02
	LogCI ₅₀ (M)	−8,92 ^c	0,18 (67)	−8,97	−8,88
Noréthynodrel	Sommet (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Base (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Pente de Hill	−1,01	0,38 (68)	−1,10	−0,92
	LogCI ₅₀ (M)	−6,39	0,27 (68)	−6,46	−6,33
Noréthindrone^c	Sommet (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Base (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Pente de Hill	−1,41	0,32 (27)	−1,53	−1,28
	LogCI ₅₀ (M)	−5,73	0,27 (27)	−5,84	−5,62

^a Les valeurs moyennes (n) ± écart-type (ET) ont été calculées à partir d’estimations des paramètres d’ajustement des courbes (équation de Hill à quatre paramètres) issus des essais sur les témoins réalisés par quatre laboratoires dans le cadre de l’étude de validation (voir annexe N de la référence 2)..

^b Les intervalles de confiance à 95 % sont fournis à titre d’orientation pour les critères d’acceptabilité

^c L’essai avec la noréthindrone était optionnel pour le volet 4 de l’étude de validation (voir référence 2, Subtask IV). Ainsi, les valeurs moyennes ± ET (n) ont été calculées grâce aux estimations des paramètres d’ajustement des courbes (équation de Hill à quatre paramètres) issus des essais sur les témoins réalisés par deux laboratoires.

La gamme des CI₅₀ dépendra de la K_d de la préparation de récepteurs et de la concentration du ligand radiomarké utilisée par chaque laboratoire. Il est admis d’effectuer les ajustements appropriés pour la fourchette des CI₅₀ en fonction des conditions de mise en œuvre de l’essai.

Démonstration des compétences du laboratoire

- Voir les paragraphes 17 et 18 ainsi que le tableau 2 de la partie «**ÉLÉMENTS DE L’ESSAI DE LIAISON AU hrER**» de la présente méthode d’essai . Chaque essai (liaison à saturation et liaison compétitive) se compose de trois essais indépendants (utilisant de nouvelles dilutions du récepteur, des produits chimiques et des réactifs) réalisés trois jours différents, chacun d’entre eux comportant trois réplicats.

Détermination de la concentration de récepteur (hrER α)

11. La concentration de récepteurs actifs varie légèrement en fonction des lots et des conditions de stockage. C'est pourquoi il convient de déterminer la concentration de récepteurs actifs du lot livré par le fournisseur. Cette étape permet d'obtenir la concentration exacte de récepteurs actifs au moment de l'essai.
12. Dans les mêmes conditions que l'essai de liaison compétitive, donc en présence de [^3H]-œstradiol à 1 nM, des concentrations nominales de 0,25; 0,5; 0,75 et 1 nM de récepteur sont incubées en absence (liaison totale) et en présence (liaison non spécifique) d'œstradiol non marqué à 1 μM . La liaison spécifique est calculée en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale, puis reportée graphiquement en fonction de la concentration nominale de récepteur. La concentration de récepteur pour laquelle la liaison spécifique correspond à 20 % du ligand radiomarké ajouté permet de déduire la concentration nominale de récepteur. C'est cette dernière qui est utilisée pour les expériences de liaison à saturation et de liaison compétitive. Souvent, cette condition sera remplie par une concentration finale de hrER de 0,5 nM.
13. Si le critère des 20 % échoue à plusieurs reprises, il faut chercher d'éventuelles erreurs dans le montage expérimental. L'incapacité à satisfaire le critère des 20 % peut suggérer que le lot de récepteurs recombinants contient très peu de sites actifs; il faut alors envisager d'employer un autre lot.

Essai à saturation

14. Huit concentrations croissantes de [^3H]-17 β -œstradiol sont évaluées en triple exemplaire en respectant les trois conditions suivantes (voir tableau 2):
 - En absence de 17 β -œstradiol non marqué et en présence d'ER. Cette condition permet de déterminer la liaison totale en mesurant la radioactivité des puits ne contenant que le [^3H]-17 β -œstradiol.
 - En présence d'une concentration de 17 β -œstradiol non marqué mille fois plus importante que celle du 17 β -œstradiol radiomarké et en présence d'ER. Cette condition vise à saturer les sites de liaison actifs avec le 17 β -œstradiol non marqué et à déterminer la liaison non spécifique déduite de la radioactivité des puits. En effet, on considère que le reste d'œstradiol chaud (radiomarké) capable de se lier au récepteur se fixe sur des sites non spécifiques, car l'œstradiol froid (non marqué) doit être en tel excès qu'il occupe tous les sites spécifiques disponibles sur les récepteurs.
 - En absence de 17 β -œstradiol non marqué et en absence d'ER (détermination de la radioactivité totale)

Préparation des solutions de [^3H]-17 β -œstradiol et de 17 β -œstradiol non marqué

15. Les dilutions de [^3H]-17 β -œstradiol sont préparées en ajoutant la solution d'essai tamponnée à une solution mère de [^3H]-17 β -œstradiol à 12 nM afin d'obtenir des

concentrations allant d'abord de 0,12 à 12 nM. Les concentrations finales de l'essai, qui vont de 0,03 à 3,0 nM, sont obtenues en ajoutant 40 µl des dilutions précédentes dans chaque puits d'essai d'une plaque microtitre 96 puits, pour un volume final de 160 µl par puits. La préparation de la solution d'essai tamponnée, de la solution mère et des dilutions de [³H]-17β-œstradiol ainsi que la détermination des concentrations sont décrites en détail dans le protocole de FW (2).

16. Les dilutions des solutions éthanoliques de 17β-œstradiol sont préparées par ajout de solution d'essai tamponnée de façon à obtenir huit concentrations croissantes allant d'abord de 0,06 à 6 µM. Les concentrations finales de l'essai, de 0,03 à 3,0 µM, sont obtenues en ajoutant 80 µl des dilutions précédentes dans chaque puits d'essai d'une plaque microtitre 96 puits, pour un volume final de 160 µl par puits. La concentration finale de 17β-œstradiol non marqué dans chaque puits d'essai de liaison non spécifique doit être mille fois supérieure à celle du [³H]-17β-œstradiol. La préparation des dilutions de 17β-œstradiol non marqué est décrite en détail dans le protocole de FW (2).
17. C'est la concentration nominale de récepteur pour laquelle on obtient une liaison spécifique de 20 ± 5 % qui est utilisée pour l'essai (voir paragraphes 12-13). La solution de hrERα doit être préparée immédiatement avant emploi.
18. Les plaques microtitre 96 puits sont préparées conformément au tableau 2, avec 3 réplicats par concentration. L'appendice 2 présente un exemple de plaque indiquant la concentration et la distribution des volumes par puits du [³H]-17β-œstradiol, du 17β-œstradiol non marqué, de la solution tamponnée et du récepteur.

Tableau 2: Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison à saturation

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	
<i>A</i>	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Liaison totale (solvant)
<i>B</i>	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
<i>C</i>													
<i>D</i>	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Liaison non spécifique
<i>E</i>	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
<i>F</i>													
<i>G</i>													
<i>H</i>													

[³H] E₂: [³H]-17β-œstradio

ER: estrogen receptor (récepteur des œstrogènes)

E₂: 17β-œstradiol non marqué

19. Les plaques d'essai microtitre sont placées sur un rotateur et incubées entre 2 et 8 °C pendant 16 à 20 heures.

Mesure du [³H]-17β-œstradiol lié au hrERα

20. Pour séparer le [³H]-17β-œstradiol lié au hrERα du [³H]-17β-œstradiol libre, 80 µl d'une suspension froide de DCC sont d'abord ajoutés dans chaque puits, puis les plaques microtitre sont agitées pendant 10 minutes, et enfin centrifugées pendant 10 minutes à 2 500 tours/min environ. Afin de limiter le plus possible la dissociation du [³H]-17β-œstradiol lié au hrERα pendant ce processus, il est extrêmement important que les solutions tamponnées et les puits d'essai soient maintenus entre 2 et 8 °C et d'enchaîner rapidement les étapes du processus. Un agitateur pour plaques microtitre est nécessaire pour un traitement efficace et rapide.
21. Les 50 µl de surnageant comprenant le [³H]-17β-œstradiol lié au hrERα sont alors prélevés très soigneusement pour éviter de contaminer les puits par contact avec le DCC, puis placés dans une deuxième plaque microtitre.
22. Chaque puits de cette plaque (de A1 à B12 et de D1 à E12) reçoit ensuite 200 µl de scintillateur liquide capable de convertir l'énergie cinétique du rayonnement nucléaire en énergie lumineuse. Les puits G1-H12 (correspondant aux désintégrations par minute - dpm - totales) représentent les dilutions successives du [³H]-17β-œstradiol (40 µl) qui doivent être versées directement dans les puits de la plaque de mesure contenant le scintillateur liquide, comme le montre le tableau 3. Ces puits ne contiennent donc que 200 µl de scintillateur liquide et la dilution appropriée de [³H]-17β-œstradiol. Ils indiquent la quantité de [³H]-17β-œstradiol (exprimée en dpm) ajoutée à chaque série de puits pour la liaison totale et la liaison non spécifique.

Tableau 3: Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison à saturation, mesure de la radioactivité

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER			Liaison totale (solvant)
B	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,03 μM E ₂			0,06 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,06 μM E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,08 μM E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,10 μM E ₂			Liaison non spécifique
E	0,30 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,30 μM E ₂			0,60 nM [³ H] E ₂ + ER + 0,60 μM E ₂			1,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 1,0 μM E ₂			3,0 nM [³ H] E ₂ + ER + 3,0 μM E ₂			
F													
G	0,03 nM [³ H] E ₂ (total en dpm)			0,06 nM [³ H] E ₂			0,08 nM [³ H] E ₂			0,10 nM [³ H] E ₂			Total en dpm*

H	0,30 nM [³ H] E ₂	0,60 nM [³ H] E ₂	1,0 nM [³ H] E ₂	3,0 nM [³ H] E ₂	

[³H] E₂: [³H]-17β-œstradiol

ER: estrogen receptor (récepteur des œstrogènes)

E₂: 17β-œstradiol non marqué

dpm: désintégrations par minute

* Les dilutions en série d'œstradiol tritié (chaud) sont ajoutées directement aux 200 µl de scintillateur liquide contenus dans les puits G1 à H12.

23. La mesure de la scintillation commence au moins deux heures après l'ajout, et dure 40 minutes par puits. Les désintégrations par minute par puits (dpm/puits) sont déterminées grâce à un compteur à scintillation pour plaque microtitre, en appliquant une correction de l'extinction. Il est aussi possible, à défaut de compteur à scintillation pour plaque microtitre, d'analyser les échantillons à l'aide d'un compteur classique. Dans ce cas, il est envisageable de raccourcir la durée de mesure.

Essai de liaison compétitive

24. L'essai de liaison compétitive mesure les liaisons du [³H]-17β-œstradiol en concentration fixe en présence de concentrations croissantes de produit chimique d'essai. Il requiert trois réplicats simultanés pour chaque concentration. En outre, trois essais non simultanés sont réalisés pour chaque produit chimique d'essai. L'essai nécessite au moins une plaque microtitre 96 puits

Témoins

25. Le solvant et les témoins concomitants (substance œstrogénique de référence, ligand faible et non-ligand) doivent être inclus dans chaque expérience de l'essai. Pour chaque essai, une même plaque sert à établir les courbes pour toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins (ligand faible et non-ligand). Toutes les autres plaques doivent contenir (i) une concentration élevée (remplacement maximal) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI₅₀) d'E₂ et du ligand faible, en triple exemplaire; (ii) le témoin avec solvant et des ligands non spécifiques, avec au moins trois réplicats respectivement. Les procédures de préparation de la solution d'essai tamponnée, des solutions du produit chimique d'essai, des témoins, de [³H]-17β-œstradiol et du hrERα sont décrites dans la référence 2 (annexe K, voir le protocole d'essai de FW).

Témoin avec solvant:

26. Le témoin avec solvant confirme que ce dernier n'interagit pas avec le système d'essai et permet de mesurer la liaison totale (LT). De préférence, on choisira l'éthanol comme solvant. Si la concentration maximale du produit chimique d'essai n'est pas soluble dans l'éthanol, il est aussi possible d'avoir recours au DMSO. À la fin de l'essai, la concentration finale d'éthanol ou de DMSO, le cas échéant, s'élèvera à 1,5 % par puits d'essai, et ne devra pas dépasser 2 %.

Témoin avec solution tamponnée:

27. Le témoin avec solution tamponnée (TST) contient tous les éléments de l'essai sauf le solvant et le produit chimique d'essai. Les résultats du TST sont comparés à ceux obtenus pour le témoin avec solvant afin de vérifier que le solvant utilisé ne perturbe pas le système d'essai.

Ligand fort (substance œstrogénique de référence)

28. Le 17 β -œstradiol (CAS 50-28-2) est le ligand endogène qui présente une forte affinité de liaison aux ER de type alpha. Il convient de tracer une courbe de référence pour le 17 β -œstradiol non marqué pour chaque essai de liaison compétitive au hrER α , afin d'évaluer la variabilité des essais répétés au fil du temps dans le même laboratoire. Huit solutions de 17 β -œstradiol non marqué sont préparées dans l'éthanol, les concentrations d'essai allant de 100 nM à 10 pM (de -7[logM] à -11[logM]), avec les intervalles suivants: -7[logM], -8[logM], -8,5[logM], -9[logM], -9,5[logM], -10[logM] et -11[logM]). La concentration maximale de 17 β -œstradiol non marqué (1 μ M) sert également d'indicateur de liaison non spécifique (LNS). Cette concentration est donc distinguée par la mention «LNS» dans le tableau 4, même si elle fait également partie de la courbe de référence.

Ligand faible

29. Un ligand faible (noréthynodrel [CAS 68-23-5] ou noréthindrone [CAS 68-22-4]) est inclus pour démontrer la sensibilité de chaque expérience et évaluer la variabilité au fil des répétitions de l'essai. Huit solutions de ligand faible sont préparées dans l'éthanol, avec des concentrations d'essai allant de 3 nM à 30 μ M (de -8,5[logM] à -4,5[logM]), avec les intervalles suivants: -4,5[logM], -5[logM], -5,5[logM], -6[logM], -6,5[logM], -7[logM], -7,5[logM] et -8,5[logM].

Non-Ligand

30. On fera appel à l'octyltriéthoxysilane (OTES, CAS 2943-75-1) comme témoin négatif (non-ligand). Ce composé permet de vérifier que tel qu'il est mis en œuvre, l'essai détermine les produits chimiques d'essai qui ne se lient pas au hrER α . Huit solutions de non-ligand sont préparées dans l'éthanol, avec des concentrations d'essai allant de 0,1 nM à 1 000 μ M (de -10[logM] à -3[logM]), les intervalles étant définis par incrémentation logarithmique. Il est aussi possible d'utiliser à la place le phtalate de dibutyle (DBP) comme témoin non-ligand. Sa solubilité maximale s'élève à -4[logM].

Concentration de hrER α

31. C'est la quantité de récepteur pour laquelle on obtient une liaison spécifique de 20 ± 5 % du ligand radiomarké à 1 nM qui est utilisée pour l'essai (voir paragraphes 12-13 de l'appendice 2). La solution de hrER α doit être préparée immédiatement avant emploi.

[³H]-17 β -œstradiol

32. La concentration de [³H]-17 β -œstradiol dans les puits d'essai doit être 1,0 nM.

Produits chimiques d'essai

33. Un premier essai s'impose pour déterminer la limite de solubilité de chaque produit chimique d'essai ainsi que la fourchette de concentrations qui convient pour l'essai. La limite de solubilité de chaque produit chimique d'essai doit d'abord être déterminée dans le solvant, puis confirmée dans les conditions de l'essai. La concentration finale utilisée dans l'essai ne doit pas dépasser 1 mM. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur s'effectue à l'aide d'un témoin avec solvant et d'une série logarithmique de huit dilutions de la concentration maximale acceptable (p.ex. 1 mM ou moins, selon la limite de solubilité). On relève alors l'apparition d'un trouble ou d'un précipité, le cas échéant (voir aussi le paragraphe 35). Le produit chimique d'essai est analysé grâce aux courbes obtenues pour la série logarithmique de huit concentrations établie par l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Il faut ajuster les concentrations des deuxième et troisième expériences de façon à mieux caractériser la courbe concentration-réponse.
34. Les dilutions du produit chimique d'essai sont préparées dans le solvant approprié (voir paragraphe 26 de l'appendice 2). Si la concentration maximale du produit chimique d'essai n'est soluble ni dans l'éthanol, ni dans le DMSO, et si l'ajout de solvant supplémentaire risque de se traduire par un dépassement de la concentration maximale de solvant acceptable dans le puits en fin d'essai, c'est la concentration immédiatement inférieure qui fait office de concentration maximale. Le cas échéant, il est possible d'ajouter une concentration supplémentaire au début de la série de concentrations, les autres concentrations demeurant inchangées.
35. On observera attentivement les puits au moment d'y verser les solutions de produit chimique d'essai, car cet ajout peut provoquer un précipité. Les données relatives à tous les puits qui contiennent un précipité sont exclues de l'ajustement des courbes, et la raison de cette exclusion est consignée.
36. Si d'autres sources fournissent des données sur le $\log(CI_{50})$ d'un produit chimique d'essai, il peut être judicieux de répartir les dilutions géométriquement autour de cette valeur, par exemple à 0,5 unité logarithmique autour du $\log(CI_{50})$ attendu. Le résultat final doit correspondre à une fourchette de concentrations suffisamment étendue de part et d'autre du $\log(CI_{50})$, comprenant le «sommet» et la «base» de la courbe de liaison afin de pouvoir la caractériser correctement.

Organisation de la plaque d'essai

37. Les plaques microtitre comprennent des séries de six réplicats incubés distingués par des codes correspondant au témoin avec solvant, à la concentration maximale de substance œstrogénique de référence servant aussi d'indicateur de liaison non spécifique (LNS) et au témoin avec solution tamponnée (TST), ainsi que les incubations en triple exemplaire codées de chacune des huit concentrations du témoin non ligand (octyltriéthoxysilane), des sept concentrations inférieures de la substance œstrogénique de référence, des huit concentrations du ligand faible et des huit concentrations de chaque produit chimique

d'essai (PCE). Un exemple d'organisation de la plaque d'essai pour obtenir des courbes complètes à partir de toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins est fourni ci-dessous dans le tableau 4. D'autres plaques microtitre sont utilisées pour les produits chimiques d'essai, et comprennent aussi 1) une concentration élevée (remplacement maximal) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI_{50}) d'E2 et du ligand faible, en triple exemplaire; 2) les témoins avec solvant et des ligands non spécifiques, chacun en six réplicats (tableau 5). Un exemple d'organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive de trois produits chimiques d'essai inconnus est disponible dans l'appendice 2.3. Les concentrations indiquées dans les tableaux 4 et 5 sont les concentrations finales de l'essai. La concentration maximale d'E2 doit s'élever à 1×10^{-7} M, tandis que pour le ligand faible, c'est la concentration maximale de la plaque 1 qui est utilisée. Le laboratoire détermine la CI_{50} à partir de sa base de données historiques. Cette valeur doit être similaire à celle issue des études de validation (voir tableau 1).

Tableau 4: Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive, courbes concentration-réponse complètes pour la substance œstrogénique de référence et les témoins (plaque 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LT (solvant seul)			LT (solvant seul)			LNS			LNS		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Blanc*		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Blanc (E2 chaud)**			Blanc (E2 chaud)**			Témoin avec solution tamponnée			Témoin avec solution tamponnée		

Dans cet exemple, le ligand faible est le noréthynodrel (NE)

* Blanc réel, puits non utilisé

** Blanc non utilisé pendant l'incubation, mais servant à confirmer la radioactivité totale ajoutée.

Tableau 5: Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive, courbes concentration-réponse complètes pour les produits chimiques d'essai et les témoins de la plaque.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LT (solvant seul)			LT (solvant seul)			LNS			LNS		
B	PCE1 (1×10^{-3})			PCE1 (1×10^{-4})			PCE1 (1×10^{-5})			PCE1 (1×10^{-6})		
C	PCE1 (1×10^{-7})			PCE1 (1×10^{-8})			PCE1 (1×10^{-9})			PCE1 (1×10^{-10})		

D	PCE2 (1×10^{-3})	PCE2 (1×10^{-4})	PCE2 (1×10^{-5})	PCE2 (1×10^{-6})
E	PCE2 (1×10^{-7})	PCE2 (1×10^{-8})	PCE2 (1×10^{-9})	PCE2 (1×10^{-10})
F	PCE3 (1×10^{-3})	PCE3 (1×10^{-4})	PCE3 (1×10^{-5})	PCE3 (1×10^{-6})
G	PCE3 (1×10^{-7})	PCE3 (1×10^{-8})	PCE3 (1×10^{-9})	PCE3 (1×10^{-10})
H	NE (CI ₅₀)	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)	E2 (CI ₅₀)	E2 (1×10^{-7})

Dans cet exemple, le ligand faible est le noréthynodrel (NE)

Mise en œuvre de l'essai de liaison compétitive

38. Comme le montre le tableau 6, on ajoute dans les puits 80 µl de témoin avec solvant, de témoin avec solution tamponnée, de substance œstrogénique de référence, de ligand faible, de non-ligand et de produit chimique d'essai. Chaque puits reçoit ensuite 40 µl d'une solution de [³H]-17β-œstradiol à 4 nM. Après 10 à 15 minutes de rotation douce à une température située entre 2 et 8 °C, 40 µl d'une solution de hrERα sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques d'essai microtitre sont placées sur un rotateur et incubées entre 2 et 8 °C pendant 16 à 20 heures.

Tableau 6: Volume des éléments de l'essai de liaison compétitive au hrER, plaques microtitre

<i>Volume (µl)</i>	<i>Constituant</i>
80	17β-œstradiol non marqué, noréthynodrel, OTES, produits chimiques d'essai, solvant ou solution tamponnée
40	Solution de [³ H]-17β-œstradiol à 4 nM
40	Solution de hrERα de concentration déterminée par l'essai préliminaire
160	Volume total dans chaque puits d'essai

39. Le [³H]-17β-œstradiol lié au hrERα est séparé du [³H]-17β-œstradiol libre en ajoutant 80 µl d'une suspension froide de DCC dans chaque puits, puis quantifié en suivant la méthode décrite dans les paragraphes 20-23 concernant l'essai de liaison à saturation.

40. Les puits H1 à H6 («blanc (E2 chaud)» dans le tableau 4) fournissent les désintégrations par minute du [³H]-17β-œstradiol dans 40 µl. Les aliquotes de 40 µl sont versées directement dans le scintillateur liquide contenu dans les puits H1 – H6.

Critères d'acceptabilité

Essai de liaison à saturation

41. La courbe de liaison spécifique doit atteindre un plateau pour les concentrations les plus élevées de [³H]-17β-œstradiol, le cas échéant, ce qui traduit la saturation des hrERα avec le ligand.

42. Il faut que la liaison spécifique induite par le [3H]-17β-œstradiol à 1 nM corresponde à une radioactivité égale à 15 à 25 % de la moyenne de la radioactivité totale mesurée dans tous les essais. On peut occasionnellement admettre quelques valeurs en dehors de cette fourchette, mais si les résultats de l'essai la dépassent régulièrement ou si un essai donne des résultats très éloignés de cette fourchette, il convient d'ajuster la concentration de protéine et de répéter l'essai de liaison à saturation.
43. Les données doivent aboutir à une représentation de Scatchard linéaire.
44. La liaison non spécifique ne doit pas être excessive: elle est généralement inférieure à 35 % de la liaison totale. Le ratio de ces liaisons pourra néanmoins parfois dépasser ce chiffre s'agissant de mesurer des désintégrations par minutes très faibles pour la concentration d'essai de 17β-œstradiol radiomarké la plus basse.

Essai de liaison compétitive

45. Des concentrations croissantes de 17β-œstradiol non marqué doivent déplacer le [3H]-17β-œstradiol des récepteurs selon un modèle de liaison compétitive sur un seul site.
46. Il faut que la CI₅₀ de la substance œstrogénique de référence (17β-œstradiol) soit *grosso modo* égale à la concentration molaire de [3H]-17β-œstradiol plus la K_d établie par l'essai de liaison à saturation.
47. La liaison spécifique totale doit rester cohérente et s'élever à 20 ± 5 % lorsque la concentration moyenne de la radioactivité totale ajoutée à chaque puits vaut 1 nM pour tous les essais. On peut occasionnellement admettre quelques valeurs en dehors de cette fourchette, mais si les résultats de l'essai la dépassent régulièrement ou si un essai donne des résultats très éloignés de cette fourchette, il convient d'ajuster la concentration de protéine et de répéter l'essai de liaison à saturation.
48. Le solvant ne doit pas modifier la sensibilité ou la reproductibilité de l'essai. Les résultats du témoin avec solvant (puits TS) sont comparés à ceux obtenus pour le témoin avec solution tamponnée (TST) afin de vérifier que le solvant utilisé ne perturbe pas le système d'essai. Quand le solvant n'a aucun effet sur l'essai, les résultats correspondant au TS et au TST sont comparables.
49. Le non-ligand ne doit pas remplacer plus de 25 % du [3H]-17β-œstradiol lié au hrERα à des concentrations allant jusqu'à 10⁻³ M (OTES) ou 10⁻⁴ M (DBP).
50. Des critères de performance ont été définis pour la substance œstrogénique de référence et pour les deux ligands faibles (p.ex. noréthynodrel et noréthindrone) à partir des données de l'étude de validation de l'essai de liaison au hrER de FW (annexe N de la référence 2). Les intervalles de confiance à 95 % découlent des valeurs moyennes (n) +/- ET calculées grâce à l'ensemble des essais témoins effectués par les laboratoires participant à l'étude de validation. Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés pour les paramètres

d'ajustement des courbes (p.ex. sommet, base, pente de Hill et $\log CI_{50}$) correspondant à la substance œstrogénique de référence et aux ligands faibles ainsi que pour le $\log_{10} ALR$ des ligands faibles par rapport à la substance œstrogénique de référence. Ces intervalles sont fournis à titre de critères de performance des témoins positifs. Le tableau 1 présente les fourchettes attendues pour les paramètres d'ajustement des courbes pouvant faire office de critères de performance. En pratique, la fourchette de la CI_{50} peut varier légèrement en fonction de la K_d de la préparation de récepteurs et de la concentration du ligand.

51. Aucun critère de performance n'a été établi pour les paramètres d'ajustement des courbes correspondant aux produits chimiques d'essai du fait de la grande diversité des composés potentiellement testés ainsi que des affinités et résultats correspondants (p.ex. ajustement complet, partiel ou nul des courbes). On fera toutefois appel à un avis professionnel pour analyser les résultats de chaque essai sur un produit chimique. Il convient d'avoir recours à une fourchette de concentrations d'essai suffisante pour définir clairement le sommet de la courbe de liaison compétitive (p.ex. pour induire 90 à 100 % de liaison). La variabilité entre les réplicats de chaque concentration du produit chimique d'essai et entre les trois essais non simultanés doit rester raisonnable et défendable sur le plan scientifique. Il est nécessaire que les témoins utilisés pour chaque essai sur un produit chimique d'essai soient proches des mesures de la performance documentées pour cette méthode de FW, et en harmonie avec les données historiques obtenues pour les témoins par chaque laboratoire.

ANALYSE DES DONNÉES

Essai de liaison à saturation

52. Cet essai mesure la liaison totale et la liaison non spécifique. Ces valeurs permettent de calculer la liaison spécifique induite par des concentrations croissantes de $[^3H]$ -17 β -œstradiol à l'équilibre, en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale. La courbe reportant la liaison spécifique en fonction de la concentration de $[^3H]$ -17 β -œstradiol doit atteindre un plateau pour la liaison spécifique maximale, qui indique la saturation des hrER α par le $[^3H]$ -17 β -œstradiol. De plus, l'analyse des données documente la liaison du $[^3H]$ -17 β -œstradiol à un site de liaison unique à haute affinité. Il faut que la courbe de liaison à saturation indique les liaisons non spécifique, totale et spécifique. Une régression non linéaire (p.ex. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) permet d'approfondir l'analyse des données, et les résultats sont finalement présentés sous forme d'une représentation de Scatchard.
53. L'analyse des données doit déterminer la B_{max} et la K_d en se fondant uniquement sur les données de liaison totale, étant supposé que la liaison non spécifique est linéaire, à moins de justifier le recours à une autre méthode. Par ailleurs, on détermine le meilleur ajustement des courbes à l'aide d'une analyse de régression solide, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. La méthode choisie pour cette analyse de régression solide sera indiquée. Une correction relative à la perte de ligand (p.ex. avec la méthode de Swillens,

1995) sera toujours appliquée pour déterminer la $B_{\max}$ et la K_d à partir des données de liaison à saturation.

Essai de liaison compétitive

54. La courbe de liaison compétitive présente la liaison spécifique du [^3H]-17 β -œstradiol en fonction de la concentration (en $\log_{10}$) du compétiteur. La concentration de produit chimique d'essai qui inhibe 50 % de la liaison spécifique maximale du [^3H]-17 β -œstradiol correspond à la CI_{50} .
55. Des estimations des $\log(\text{CI}_{50})$ des témoins positifs (p.ex. substance œstrogénique de référence et ligand faible) sont obtenues grâce à un logiciel approprié d'ajustement de courbe par méthode non linéaire d'après une équation de Hill à quatre paramètres (p.ex. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Ces ajustements se font sans imposer de limites au sommet, à la base, à la pente et au $\log(\text{CI}_{50})$ des courbes. Le meilleur ajustement des courbes est établi grâce à une analyse de régression solide, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. Aucune correction n'est effectuée pour la perte de ligand. Après l'analyse initiale, chaque courbe de liaison est examinée pour vérifier qu'elle est bien ajustée au modèle. L'affinité de liaison relative (ALR) du ligand faible est exprimée en pourcentage à partir du rapport entre le $\log(\text{CI}_{50})$ du ligand faible et le $\log(\text{CI}_{50})$ du 17 β -œstradiol. Les résultats des témoins positifs et du témoin non ligand sont évalués à partir des mesures de la performance de l'essai indiquées dans les paragraphes 45-50 de l'appendice 2.
56. Les données obtenues pour tous les produits chimiques d'essai doivent être analysées par étape pour veiller à l'évaluation appropriée des résultats et à la classification correcte de chaque courbe de liaison compétitive. Ainsi, pour chaque essai sur un produit chimique, il est d'abord recommandé d'effectuer une analyse des données normalisée identique à celle utilisée pour la substance œstrogénique de référence et les témoins avec ligand de faible affinité (voir paragraphe 55 précédent). Cette étape est suivie d'un examen technique de l'ajustement des paramètres de la courbe et d'un examen visuel pour déterminer dans quelle mesure les données correspondent à la courbe de liaison compétitive obtenue pour chaque essai. Cet examen technique repose sur trois observations indiquant que l'essai et les analyses ont été réalisés correctement: une baisse du pourcentage de [^3H]-17 β -œstradiol lié aux sites spécifiques en fonction de la concentration, une faible variabilité entre les réplicats techniques de chaque concentration de produit chimique d'essai et la cohérence des paramètres d'ajustement entre les trois essais.

Interprétation des données

57. Sous réserve du respect de l'ensemble des critères d'acceptabilité, un produit chimique d'essai est considéré comme ligand du hrER α si sa courbe de liaison peut être ajustée et si le point le plus bas de la courbe de réponse obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison inférieure à 50 % (graphique 1).

58. Sous réserve du respect de l'ensemble des critères d'acceptabilité, un produit chimique d'essai est considéré comme non-ligand du hrER α si:

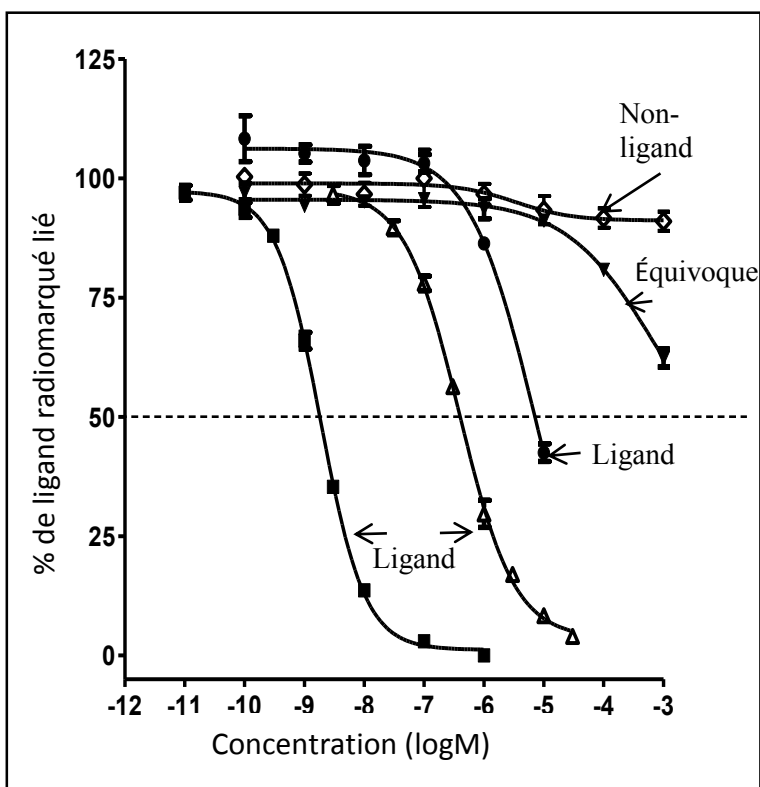
- sa courbe de liaison peut être ajustée et si le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison supérieure à 75 %, ou
- sa courbe de liaison ne peut pas être ajustée et si la moyenne des pourcentages de liaison non lissés de tous les groupes de concentration de l'essai est supérieure à 75 %.

59. Les produits chimiques d'essai sont considérés comme équivoques si aucune des conditions qui précèdent n'est satisfaite (p.ex. le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée correspond à une liaison située entre 76 et 51 %).

Tableau 7: Critères de classification d'un produit chimique d'essai fondée sur sa courbe de liaison compétitive.

Classification	Critères
Ligand ^a	Il est possible d'ajuster la courbe. Le point le plus bas de la courbe de réponse obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison inférieure à 50 %.
Non-ligand ^b	S'il est possible d'ajuster la courbe, le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison supérieure à 75 %. S'il n'est pas possible d'ajuster la courbe, la moyenne des pourcentages de liaison non lissés de tous les groupes de concentration de l'essai est supérieure à 75 %.
Équivoque ^c	Essai évaluable qui ne peut être classé ni comme ligand, ni comme non-ligand. (P.ex. le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée correspond à une liaison située entre 76 et 51 %.)

Graphique 1: Exemples de classification d'un produit chimique d'essai grâce à la courbe de liaison compétitive.



60. Les différents essais réalisés par un laboratoire sur un produit chimique d'essai sont combinés en attribuant des valeurs numériques à chaque essai et en calculant la moyenne de ces valeurs, comme l'indique le tableau 8. Les résultats combinés des essais de chaque laboratoire sont alors comparés à la classification attendue pour chaque produit chimique d'essai.

Table 8: Method for classification of test chemical using multiple runs within a laboratory

Attribution d'une valeur à chaque essai:	
Classification	Valeur numérique
Ligand	2
Équivoque	1
Non-ligand	0
Classification selon la moyenne des valeurs numériques de toutes les expériences:	
Classification	Valeur numérique
Ligand	Moyenne $\geq 1,5$
Équivoque	$0,5 \leq \text{Moyenne} < 1,5$
Non-ligand	Moyenne $< 0,5$

61. Voir le paragraphe 24 de la partie «**ÉLÉMENTS DE L’ESSAI DE LIAISON AU hrER**» de la présente méthode d'essai.

Appendice 2.1

LISTE DE TERMES

[³H]E₂: 17β-œstradiol radiomarké au tritium

DCC: *dextran-coated charcoal* (charbon enrobé de dextrane)

E₂: 17β-œstradiol non marqué (inerte)

Solution d'essai tamponnée: solution composée de 10 mM de tris, 10 mg/ml d'albumine sérique bovine, 2 mM de DTT, 10 % de glycérol et 0,2 mM de leupeptine, à pH 7,5

hrERα: récepteur des œstrogènes alpha recombinant humain (domaine de liaison du ligand)

Réplicat: un des multiples puits qui contiennent les mêmes éléments aux mêmes concentrations et sont testés simultanément dans un même essai. Le présent protocole prévoit que chaque concentration du produit chimique d'essai soit soumise à l'essai en triple exemplaire, c'est-à-dire que trois réplicats de chacune d'elle sont testés simultanément.

Essai: série complète d'expériences simultanées dans les puits d'une plaque microtitre livrant l'ensemble des données nécessaires pour caractériser l'affinité de liaison au hrERα d'un produit chimique d'essai, soit la quantité totale de [³H]-17β-œstradiol ajoutée dans un puits, la liaison maximale au hrERα du [³H]-17β-œstradiol, la liaison non spécifique et la liaison totale pour diverses concentrations du produit chimique d'essai. Un essai peut reposer sur un seul puits d'essai (réplicat) par concentration, mais dans la mesure où le présent protocole exige des expériences en triple exemplaire, un essai requiert ici trois puits d'essai par concentration. De plus, le présent protocole impose de réaliser trois essais indépendants (non simultanés) par produit chimique.

Appendice 2.2

ESSAI CLASSIQUE DE SATURATION PAR LE [³H]-17B-ŒSTRADIOL EN TRIPLE EXEMPLAIRE

Essai classique de saturation par le [³ H]-17β-œstradiol en triple exemplaire												
Position	Réplicat	Code par type de puits	Concentration initiale d'E2 chaud (nM)	Volume d'E2 chaud (µl)	Concentration finale d'E2 chaud (nM)	Concentration initiale d'E2 froid (µM)	Volume d'E2 froid (µl)	Concentration finale d'E2 froid (µM)	Volume de solution tamponnée (µl)	Volume de récepteur (µl)	Volume total dans les puits	
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160	
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160	
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160	
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160	
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160	
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160	
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160	
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160	
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160	
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160	
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160	
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160	
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160	
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160	
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160	
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160	
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160	
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160	
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160	
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160	
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160	
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160	
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160	
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160	
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160	
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160	
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160	
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160	
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160	
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160	
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160	
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160	
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160	
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160	

D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160

Essai classique de saturation par le [3H]-17 β -œstradiol en trois exemplaires											
Position	Réplicat	Code par type de puits	Concentration initiale d'E2 chaud (nM)	Volume d'E2 chaud (μl)	Concentration finale d'E2 chaud (nM)	Concentration initiale d'E2 froid (μM)	Volume d'E2 froid (μl)	Concentration finale d'E2 froid (μM)	Volume de solution tamponnée (μl)	Volume de récepteur (μl)	Volume total dans les puits
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Chaud	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Chaud	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Chaud	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Chaud	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Chaud	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Chaud	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Chaud	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Chaud	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Chaud	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Chaud	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Chaud	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Chaud	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Chaud	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Chaud	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Chaud	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Chaud	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Chaud	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Chaud	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Chaud	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Chaud	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Chaud	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Chaud	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Chaud	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Chaud	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Veuillez noter que les puits codés «chaud» sont vides pendant l'incubation. Les 40 μl qui y sont ensuite ajoutés ne servent qu'au comptage par scintillation.

Appendice 2.3: Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de solution mère de hrER (µl)	Volume de solution tamponnée(µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque de dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur(M)
S	A1	1	liaison totale	LT	LT1	-	40		40	80	160	-
S	A2	2	liaison totale	LT	LT2	-	40		40	80	160	-
S	A3	3	liaison totale	LT	LT3	-	40		40	80	160	-
S	A4	1	liaison totale	LT	LT4	-	40		40	80	160	-
S	A5	2	liaison totale	LT	LT5	-	40		40	80	160	-
S	A6	3	liaison totale	TB	LT6	-	40		40	80	160	-
S	A7	1	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A8	2	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A9	3	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A10	1	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A11	2	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A12	3	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	B1	1	E2 froid	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B2	2	E2 froid	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B3	3	E2 froid	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B4	1	E2 froid	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B5	2	E2 froid	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B6	3	E2 froid	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B7	1	E2 froid	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B8	2	E2 froid	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B9	3	E2 froid	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B10	1	E2 froid	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	B11	2	E2 froid	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	B12	3	E2 froid	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	C1	1	E2 froid	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C2	2	E2 froid	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C3	3	E2 froid	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C4	1	E2 froid	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C5	2	E2 froid	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C6	3	E2 froid	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C7	1	E2 froid	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C8	2	E2 froid	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C9	3	E2 froid	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C10	1	blanc	blanc	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	blanc	blanc	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	blanc	blanc	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	noréthynodrel	NE	LF1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D2	1	noréthynodrel	NE	LF1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D3	1	noréthynodrel	NE	LF1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D4	1	noréthynodrel	NE	LF2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D5	1	noréthynodrel	NE	LF2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D6	1	noréthynodrel	NE	LF2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D7	1	noréthynodrel	NE	LF3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D8	1	noréthynodrel	NE	LF3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D9	1	noréthynodrel	NE	LF3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D10	1	noréthynodrel	NE	LF4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	D11	1	noréthynodrel	NE	LF4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	D12	1	noréthynodrel	NE	LF4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de la solution mère de hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée(µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur(M)
S	E1	1	noréthynodrel	NE	LF	6.00E-07-	40		40	80	160	3.0E-07
S	E2	2	noréthynodrel	NE	LF	6.00E-07-	40		40	80	160	3.0E-07
S	E3	3	noréthynodrel	NE	LF	6.00E-07-	40		40	80	160	3.0E-07
S	E4	1	noréthynodrel	NE	LF	2.00E-07-	40		40	80	160	1.0E-07
S	E5	2	noréthynodrel	NE	LF	2.00E-07-	40		40	80	160	1.0E-07
S	E6	3	noréthynodrel	NE	LF	2.00E-07-	40		40	80	160	1.0E-07
S	E7	1	noréthynodrel	NE	LF	6.00E-08-	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E8	2	noréthynodrel	NE	LF	6.00E-08-	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E9	3	noréthynodrel	NE	LF	6.00E-08-	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E10	1	noréthynodrel	NE	LF	6.00E-09-	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E11	2	noréthynodrel	NE	LF	6.00E-09-	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E12	3	noréthynodrel	NE	LF	6.00E-09-	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES	2.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES	2.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES	2.00E-10	40	-	40	-	160	1.0E-10
S	H1	1	chaud	C	C	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	1	chaud	C	C	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	1	chaud	C	C	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	chaud	C	C	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	1	chaud	C	C	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	1	chaud	C	C	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	Tampon	TST	TST	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	1	Tampon	TST	TST	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	1	Tampon	TST	TST	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	Tampon	TST	TST	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	1	Tampon	TST	TST	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	1	Tampon	TST	TST	-	40	80	40	-	160	-

Veuillez noter que les puits codés «chaud» sont vides pendant l'incubation. Les 40 µl qui y sont ensuite ajoutés ne servent qu'au comptage par scintillation.

Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de la solution mère de hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée(µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	A1	1	liaison totale	LT	LT1	-	40	-	40	80	160	-
	A2	2	liaison totale	LT	LT2	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	liaison totale	LT	LT3	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	liaison totale	LT	LT4	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	liaison totale	LT	LT5	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	liaison totale	LT	LT6	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A8	2	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A9	3	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A10	1	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A11	2	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A12	3	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	B1	1	Prod. chim.	PCE1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B2	2	Prod. chim.	PCE1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B3	3	Prod. chim.	PCE1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B4	1	Prod. chim.	PCE1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B5	2	Prod. chim.	PCE1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B6	3	Prod. chim.	PCE1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B7	1	Prod. chim.	PCE1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B8	2	Prod. chim.	PCE1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B9	3	Prod. chim.	PCE1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B10	1	Prod. chim.	PCE1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B11	2	Prod. chim.	PCE1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B12	3	Prod. chim.	PCE1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	C1	1	Prod. chim.	PCE1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C3	3	Prod. chim.	PCE1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C4	1	Prod. chim.	PCE1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C5	2	Prod. chim.	PCE1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C6	3	Prod. chim.	PCE1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C7	1	Prod. chim.	PCE1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C8	2	Prod. chim.	PCE1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C9	3	Prod. chim.	PCE1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C10	1	Prod. chim.	PCE1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C11	2	Prod. chim.	PCE1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C12	3	Prod. chim.	PCE1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	D1	1	Prod. chim.	PCE2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D2	2	Prod. chim.	PCE2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D3	3	Prod. chim.	PCE2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D4	1	Prod. chim.	PCE2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D5	2	Prod. chim.	PCE2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D6	3	Prod. chim.	PCE2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D7	1	Prod. chim.	PCE2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D8	2	Prod. chim.	PCE2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D9	3	Prod. chim.	PCE2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D10	1	Prod. chim.	PCE2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D11	2	Prod. chim.	PCE2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D12	3	Prod. chim.	PCE2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	E1	1	Prod. chim.	PCE2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E2	2	Prod. chim.	PCE2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E3	3	Prod. chim.	PCE2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07

d'essai 2

Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de plaque	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de la solution mère de hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	E4	1	Prod. chim. d'essai 2	PCE2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E5	2	Prod. chim. d'essai 2	PCE2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E6	3	Prod. chim. d'essai 2	PCE2	6	-	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E7	1	Prod. chim. d'essai 2	PCE2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E8	2	Prod. chim. d'essai 2	PCE2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E9	3	Prod. chim. d'essai 2	PCE2	7	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E10	1	Prod. chim. d'essai 2	PCE2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E11	2	Prod. chim. d'essai 2	PCE2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E12	3	Prod. chim. d'essai 2	PCE2	8	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	F1	1	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F2	2	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F3	3	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F4	1	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F5	2	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F6	3	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F7	1	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F8	2	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F9	3	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F10	1	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F11	2	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F12	3	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	G1	1	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G2	2	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G3	3	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G4	1	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G5	2	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G6	3	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G7	1	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G8	2	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G9	3	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G10	1	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G11	2	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G12	3	Prod. chim. d'essai 3	PCE3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	H1	1	noréthynodrel	NE		CI50	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noréthynodrel	NE		CI50	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noréthynodrel	NE		CI50	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noréthynodrel	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noréthynodrel	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noréthynodrel	NE		1.00E-4.5	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	E2 froid	S		CI50	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	E2 froid	S		CI50	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	E2 froid	S		CI50	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	E2 froid	S		1.00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	E2 froid	S		1.00E-7	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	E2 froid	S		1.00E-7	40	0	40	80	160	

Appendice 3

PROTOCOLE DE L'ESSAI IN VITRO DE LIAISON AU RÉCEPTEUR DES ŒSTROGÈNES (ER) FONDÉ SUR LA PROTÉINE DU DOMAINE DE LIAISON DU LIGAND DE L'ERA RECOMBINANT HUMAIN CONFORMÉMENT À LA MÉTHODE DU CERi

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES (VOIR AUSSI INTRODUCTION GÉNÉRALE)

1. Cet essai *in vitro* de liaison à saturation et de liaison compétitive au récepteur des œstrogènes (ER α) fait appel au domaine de liaison du ligand (DLL) du récepteur des œstrogènes α humain (hrER α). Cette protéine chimère a été produite par le Chemicals Evaluation Research Institute (CERi, Japon), et existe sous forme de protéine de fusion glutathion-S-transférase (GST), exprimée par *E. coli*. Le protocole mis au point par le CERi a fait l'objet d'une étude de validation internationale réalisée par plusieurs laboratoires (2). Cette étude a démontré la pertinence et la fiabilité de cet essai aux fins prévues.
2. Le présent essai constitue une procédure de dépistage visant à détecter les substances qui peuvent se lier au hrER α . Il permet de déterminer la capacité d'un produit chimique d'essai à former les liaisons avec le DLL du hrER α en concurrence avec le 17 β -œstradiol. Sur le plan quantitatif, l'essai peut livrer les résultats suivants: la CI₅₀, soit la concentration de produit chimique d'essai nécessaire pour remplacer la moitié du [³H]-17 β -œstradiol lié au hrER α , et les affinités de liaison relatives (ALR) vis-à-vis du hrER α des produits chimiques d'essai par rapport au 17 β -œstradiol. L'essai visant à dépister les produits chimiques, les résultats acceptables sur le plan qualitatif sont la classification des produits chimiques d'essai soit comme ligand ou non-ligand du hrER α , soit comme équivoque, en fonction de critères définis à partir des courbes de liaison.
3. Étant donné que l'essai fait appel à un ligand radiomarké, le laboratoire doit disposer d'une autorisation de manipuler des matériaux radioactifs. Toutes les procédures qui impliquent des isotopes radioactifs ou des produits chimiques dangereux doivent être conformes aux réglementations et aux procédures établies par la législation nationale.
4. Il convient de lire les parties «INTRODUCTION GÉNÉRALE» et «ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE LIAISON AU hrER» avant de mettre en œuvre le présent essai à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont indiquées à l'appendice 1.

PRINCIPE DE L'ESSAI (VOIR AUSSI INTRODUCTION GÉNÉRALE)

5. L'essai de liaison au hrER α repose principalement sur la mesure de la capacité d'un ligand radiomarké ([³H]-17 β -œstradiol) à se lier aux ER en présence de concentrations croissantes de produit chimique d'essai (appelé «compétiteur»). Les produits chimiques d'essai qui présentent une forte affinité de liaison avec les ER entrent en concurrence avec

le ligand radiomarqué à une concentration plus faible que les composés ayant une affinité moindre vis-à-vis du récepteur.

6. L'essai comporte deux grands éléments: une expérience de liaison à saturation pour établir les paramètres de l'interaction récepteur-ligand, puis une expérience de liaison compétitive visant à déterminer dans quelle mesure un produit chimique d'essai fait concurrence à un ligand radiomarqué pour se fixer aux ER.
7. L'objectif de l'expérience de liaison à saturation est de caractériser le nombre et l'affinité de liaison des récepteurs dans un lot donné, dans la perspective de l'essai de liaison compétitive. L'expérience de liaison à saturation permet de mesurer, à l'équilibre, l'affinité d'une concentration fixe de récepteurs des œstrogènes vis-à-vis de leur ligand naturel (représentée par la constante de dissociation K_d), ainsi que la concentration de sites récepteurs actifs (B_{max}).
8. L'expérience de liaison compétitive détermine l'affinité d'une substance à se lier aux ER en concurrence avec le [^3H]-17 β -œstradiol. Cette affinité est quantifiée par la concentration de produit chimique d'essai qui, à l'équilibre, inhibe 50 % des liaisons spécifiques du [^3H]-17 β -œstradiol, appelée «concentration induisant 50 % d'inhibition» ou CI_{50}). Elle peut aussi s'exprimer par l'affinité de liaison relative (ALR, calculée par rapport à la CI_{50} de l'œstradiol mesurée séparément lors du même essai). L'expérience de liaison compétitive mesure la liaison aux ER du [^3H]-17 β -œstradiol en concentration fixe en présence d'une large fourchette (huit ordres de grandeur) de concentrations du produit chimique d'essai. Les données sont ensuite ajustées, quand c'est possible, à une forme de l'équation de Hill (Hill, 1910) décrivant le remplacement du ligand radiomarqué par un compétiteur sur un site unique. L'ampleur du remplacement du ligand radiomarqué œstradiol à l'équilibre permet alors de caractériser le produit chimique d'essai comme ligand, non-ligand ou équivoque.

MODE OPÉRATOIRE

Démonstration de l'acceptabilité de la performance de la protéine hrER

9. Avant d'effectuer de manière routinière les essais de liaison à saturation et de liaison compétitive, il faut vérifier que chaque nouveau lot de hrER α fonctionne correctement dans le laboratoire où il doit être utilisé. Cette démonstration de la performance repose sur un processus en deux étapes:
 - Essai de liaison à saturation avec du [^3H]-17 β -œstradiol pour démontrer la saturation et la spécificité vis-à-vis du hrER α . Une analyse de régression non linéaire des données obtenues (p.ex. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) permettant d'obtenir une représentation de Scatchard, livrera l'affinité de liaison au hrER α du [^3H]-17 β -œstradiol (K_d) ainsi que le nombre de récepteurs (B_{max}), pour un lot de hrER α donné.
 - Essai de liaison compétitive avec les témoins (substance œstrogénique de référence [17 β -œstradiol], ligand faible [noréthynodrel ou noréthindrone] et non-ligand

[octyltriéthoxysilane, OTES]). Chaque laboratoire est tenu de créer une base de données historiques visant à documenter que la CI_{50} et les valeurs pertinentes relatives à la substance œstrogénique de référence et au ligand faible restent cohérentes d'une expérience à l'autre et d'un lot de hrER α à l'autre. Il faut que les paramètres des courbes de liaison compétitive obtenus pour les substances témoins demeurent dans les limites de l'intervalle de confiance à 95 % (voir tableau 1) déterminées grâce aux données des laboratoires participant à l'étude de validation de l'essai (2).

Tableau 1: Critères de performance établis pour la substance œstrogénique de référence et le ligand faible dans l'essai de liaison au hrER du CERI.

Substance	Paramètre	Moyenne ^a	Écart-type(n)	Intervalle de confiance à 95%	
				Limite minimale	Limite maximale
17β-œstradiol	Sommet	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Base	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Pente de Hill	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	LogCI ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Noréthynodrel	Sommet	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Base	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Pente de Hill	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	LogCI ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Noréthindrone ^c	Sommet	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Base	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Pente de Hill	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	LogCI ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

a Les valeurs moyenne ± écart-type (ET) pour l'échantillon de taille (n) ont été calculées à partir d'estimations des paramètres d'ajustement des courbes (équation de Hill à quatre paramètres) issus des essais sur les témoins réalisés par quatre laboratoires dans le cadre de l'étude de validation (voir annexe N de la référence 2).

b Les intervalles de confiance à 95 % sont fournis à titre d'orientation pour les critères d'acceptabilité.

c L'essai avec la noréthindrone était optionnel pour le volet IV de l'étude de validation (voir référence 2, Subtask IV). Ainsi, les valeurs moyennes ± ET (n) ont été calculées grâce aux estimations des paramètres d'ajustement des courbes (équation de Hill à quatre paramètres) issus des essais sur les témoins réalisés par deux laboratoires.

La gamme des CI₅₀ dépendra de la K_d de la préparation de récepteurs et de la concentration du ligand radiomarqué utilisée par chaque laboratoire. Il est admis d'effectuer les ajustements appropriés pour la fourchette des CI₅₀ en fonction des conditions de mise en œuvre de l'essai.

Démonstration des compétences du laboratoire

- Voir les paragraphes 17 et 18 ainsi que le tableau 2 de la partie «**ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE LIAISON AU hrER**» de la présente méthode d'essai. Chaque essai (liaison à saturation et liaison compétitive) se compose de trois essais indépendants (utilisant de nouvelles dilutions du récepteur, des produits chimiques et des réactifs) réalisés trois jours différents, chacun d'entre eux comportant trois réplicats.

Détermination de la concentration de récepteur (hrERα)

- La concentration de récepteurs actifs varie légèrement en fonction des lots et des conditions de stockage. C'est pourquoi il convient de déterminer la concentration de récepteurs actifs du lot livré par le fournisseur. Cette étape permet d'obtenir la concentration exacte de récepteurs actifs au moment de l'essai.
- Dans les mêmes conditions que l'essai de liaison compétitive, donc avec 0.5 nM de [³H]-œstradiol, des concentrations nominales de 0,1, 0,2, 0,4 et 0,6 nM de récepteur sont incubées en absence (liaison totale) et en présence (liaison non spécifique) d'œstradiol non

marqué à 1 μM . La liaison spécifique est calculée en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale, puis reportée graphiquement en fonction de la concentration nominale de récepteur. La concentration de récepteur pour laquelle la liaison spécifique correspond à 40 % du ligand radiomarqué ajouté permet de déduire la concentration de récepteur. C'est cette dernière qui est utilisée pour les expériences de liaison à saturation et de liaison compétitive. Souvent, cette condition sera remplie par une concentration finale de hrER de 0,2 nM.

13. Si le critère des 40 % échoue à plusieurs reprises, il faut chercher d'éventuelles erreurs dans le montage expérimental. L'incapacité à satisfaire le critère des 40 % peut suggérer que le lot de récepteurs recombinants contient très peu de sites actifs; il faut alors envisager d'employer un autre lot.

Essai à saturation

14. Huit concentrations croissantes de [^3H]-17 β -œstradiol sont évaluées en triple exemplaire en respectant les trois conditions suivantes (voir tableau 2):
 - a. En absence de 17 β -œstradiol non marqué et en présence d'ER. Cette condition permet de déterminer la liaison totale en mesurant la radioactivité des puits ne contenant que le [^3H]-17 β -œstradiol.
 - b. En présence d'une concentration de 17 β -œstradiol non marqué deux mille fois plus importante que celle du 17 β -œstradiol radiomarqué et en présence d'ER. Cette condition vise à saturer les sites de liaison actifs avec le 17 β -œstradiol non marqué et à déterminer la liaison non spécifique déduite de la radioactivité des puits. En effet, on considère que le reste d'œstradiol chaud (radiomarqué) capable de se lier au récepteur se fixe sur des sites non spécifiques, car l'œstradiol froid (non marqué) doit être en tel excès qu'il occupe tous les sites spécifiques disponibles sur les récepteurs.
 - c. En absence de 17 β -œstradiol non marqué et en absence d'ER (détermination de la radioactivité totale)

Préparation des solutions de [^3H]-17 β -œstradiol, de 17 β -œstradiol non marqué et de hrER α

15. Une solution de [^3H]-17 β -œstradiol à 40 nM est préparée à partir d'une solution mère de [^3H]-17 β -œstradiol à 1 μM dans le DMSO dans laquelle on ajoute du DMSO jusqu'à obtenir 200 nM, puis de la solution tamponnée à température ambiante jusqu'à 40 nM. Cette solution à 40 nM est alors diluée avec de la solution tamponnée à température ambiante pour préparer la série de solutions de [^3H]-17 β -œstradiol allant de 0,313 à 40 nM (conformément à la colonne 12 du tableau 2). Les concentrations d'essai finales, qui vont de 0,0313 à 4,0 nM, sont obtenues par ajout de 10 μl des dilutions précédentes dans chaque puits d'une plaque microtitre 96 puits (voir tableaux 2 et 3). La préparation de la solution d'essai tamponnée, la caractérisation de la solution mère de [^3H]-17 β -œstradiol à partir de

son activité spécifique ainsi que la préparation des dilutions et la détermination des concentrations sont décrites en détail dans le protocole du CERI (2).

16. Les dilutions des solutions de 17 β -œstradiol non marqué sont préparées en ajoutant la solution d'essai tamponnée à la solution mère de 17 β -œstradiol à 1 nM de manière à obtenir huit concentrations croissantes allant d'abord de 0,625 à 80 μ M. Les concentrations d'essai finales, de 0,0625 à 4,0 μ M, sont obtenues par ajout de 10 μ l de ces dilutions dans chaque puits d'essai d'une plaque microtitre 96 puits servant à mesurer la liaison non spécifique (voir tableaux 2 et 3). La préparation des dilutions de 17 β -œstradiol non marqué est décrite en détail dans le protocole du CERI (2).
17. C'est la concentration de récepteur pour laquelle on obtient une liaison spécifique de 40 ± 10 % qui est choisie pour l'essai (voir paragraphes 12-13). La solution de hrER α est préparée immédiatement avant l'essai avec de la solution d'essai tamponnée glaciale, une fois que tous les puits servant à déterminer la liaison totale, la liaison non spécifique et contenant le ligand chaud uniquement ont été préparés.
18. Les plaques microtitre 96 puits sont préparées conformément au tableau 2, avec 3 réplicats par concentration de [^{3} H]-17 β -œstradiol. La répartition des volumes de [^{3} H]-17 β -œstradiol, de 17 β -œstradiol non marqué, de solution tamponnée et de récepteur est indiquée dans le tableau 3.

Tableau 2: Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison à saturation

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11**	12**
	Pour mesurer la LT			Pour mesurer la LNS			Pour mesurer le ligand chaud seul				Dilutions de E2 non marqué pour les colonnes 4 à 6 de la plaque	Dilutions de [^{3} H] E2 pour les colonnes 1 à 9 de la plaque
A	0,0313 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,0313 nM [^{3} H] E ₂ + 0,0625 μ M E ₂ + ER			0,0313 nM				0,625 μ M	0,313 nM
B	0,0625 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,0625 nM [^{3} H] E ₂ + 0,125 μ M E ₂ + ER			0,0625 nM				1,25 μ M	0,625 nM
C	30,125 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,125 nM [^{3} H] E ₂ + 0,25 μ M E ₂ + ER			0,125 nM				2,5 μ M	1,25 nM
D	0,250 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,250 nM [^{3} H] E ₂ + 0,5 μ M E ₂ + ER			0,250 nM				5 μ M	2,5 nM
E	0,50 nM [^{3} H] E ₂ + ER			0,50 nM [^{3} H] E ₂ + 1 μ M E ₂ + ER			0,50 nM				10 μ M	5 nM

F	1,00 nM [³ H] E ₂ + ER	1,00 nM [³ H] E ₂ + 2 µM E ₂ + ER	1,00 nM		20 µM	10 nM
G	2,00 nM [³ H] E ₂ + ER	2,00 nM [³ H] E ₂ + 4 µM E ₂ + ER	2,00 nM		40 µM	20 nM
H	4,00 nM [³ H] E ₂ + ER	4,00 nM [³ H] E ₂ + 8 µM E ₂ + ER	4,00 nM		80 µM	40 nM

LT: liaison totale,

LNS: liaison non spécifique

[³H] E₂: [³H]-17β-œstradiol

E₂: 17β-œstradiol non marqué

*Les concentrations indiquées sont les concentrations finales dans chaque puits.

**Les dilutions de E₂ non marqué et de [³H] E₂ peuvent être préparées sur une autre plaque.

Tableau 3: Volumes de réactif dans la plaque microtitre de l'essai de liaison à saturation

Numéro de colonne		1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
Étapes de préparation		Puits LT			Puits LNS			Puits ligand chaud		
Volume d'éléments à verser dans le puits d'essai, et ordre d'ajout	Solution	60 µl			50 µl			90 µl		
	E2 non marqué de la colonne 11 du tableau 2	-			10 µl			-		
	[³ H] E2 de la colonne 12 du tableau 2	10 µ			10 µl			10 µl		
	hrERα	30 µl			30 µl			-		
Volume d'essai total		100 µl			100 µl			100 µl		
Incubation		APRÈS 2 HEURES DE RÉACTION PAR INCUBATION						Quantification de la radioactivité immédiatement après préparation. Pas d'incubation		
Ajout de DCC à 0,4 %		Oui			Oui			Non		
Volume de DCC à 0,4 %		100 µl			100 µl			-		
Filtration		Oui			Oui			Non		
MESURE DES DPM										

Volume de quantification ajouté au mélange de scintillation	100 µl**	100 µl**	50 µl

* En cas d'utilisation d'un compteur à scintillation pour plaque microtitre pour mesurer les désintégrations par minute, le ligand chaud seul ne peut être préparé sur la même plaque que les puits servant à déterminer la LT et la LNS. Le ligand chaud seul est alors préparé sur une autre plaque.

** Si le DCC est séparé par centrifugation, les 50 µl de surnageant doivent être analysés par comptage par scintillation liquide afin d'éviter la contamination par le DCC.

19. Les plaques d'essai microtitre servant à déterminer la liaison totale et la liaison non spécifique sont incubées à température ambiante (entre 22 et 28 °C) pendant deux heures.

Mesure du [³H]-17β-œstradiol lié au hrERα

20. À l'issue des deux heures d'incubation, le [³H]-17β-œstradiol lié au hrERα est séparé du [³H]-17β-œstradiol libre par ajout de 100 µl d'une suspension glaciale de DCC à 0,4 % dans chaque puits. Les plaques sont alors placées sur la glace pendant 10 minutes, puis le mélange réactionnel et la suspension de DCC sont passés sur un filtre pour plaque microtitre afin d'éliminer le DCC. On prélève alors 100 µl de filtrat, qui sont ajoutés au scintillateur liquide dans des flacons de CSL en vue d'établir les désintégrations par minute (dpm) de chaque flacon grâce au comptage par scintillation.
21. À défaut d'un filtre pour plaque microtitre, il est également possible d'éliminer le DCC par centrifugation. Les 50 µl de surnageant comprenant le [³H]-17β-œstradiol lié au hrERα sont alors prélevés très soigneusement pour éviter de contaminer les puits par contact avec le DCC, puis soumis au comptage par scintillation.
22. Le ligand chaud seul permet de définir les désintégrations par minute (dpm) du [³H]-17β-œstradiol ajouté aux puits d'essai. La radioactivité est mesurée juste après la préparation des puits correspondants. Ces puits ne reçoivent pas de suspension de DCC, et leur contenu est transféré directement dans le scintillateur liquide. Ils indiquent la quantité de [³H]-17β-œstradiol (exprimée en dpm) ajoutée à chaque série de puits pour la liaison totale et la liaison non spécifique.

Essai de liaison compétitive

23. L'essai de liaison compétitive mesure les liaisons de [³H]-17β-œstradiol en concentration fixe en présence de concentrations croissantes de produit chimique d'essai. Il requiert trois réplicats simultanés pour chaque concentration. En outre, trois essais non simultanés sont réalisés pour chaque produit chimique d'essai. L'essai nécessite au moins une plaque microtitre 96 puits.

Témoins

24. Le solvant et les témoins concomitants (substance œstrogénique de référence, ligand faible et non-ligand) doivent être inclus dans chaque expérience de l'essai. Pour chaque essai, une même plaque sert à établir les courbes pour toutes les concentrations de la substance

œstrogénique de référence et des témoins (ligand faible et non-ligand). Toutes les autres plaques doivent contenir (i) une concentration élevée (remplacement maximal, quand le ligand remplace presque entièrement le ligand radiomarqué) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI_{50}) d'E2 et du ligand faible en triple exemplaire; (ii) les témoins avec solvant et des ligands non spécifiques, chacun en triple exemplaire. Les procédures de préparation de la solution d'essai tamponnée, des solutions de [^3H]-17 β -œstradiol, de hrER α et du produit chimique d'essai sont décrites en détail dans le protocole du CERI (2).

Témoin avec solvant:

25. Le témoin avec solvant indique que ce dernier n'interagit pas avec le système d'essai et permet en outre de mesurer la liaison totale (LT). De préférence, on choisira le DMSO comme solvant. Si la concentration maximale du produit chimique d'essai n'est pas soluble dans le DMSO, il est aussi possible d'avoir recours à l'éthanol. La concentration de DMSO dans les puits en fin d'essai doit être 2.05 %, mais pourra aller jusqu'à 2.5 % si le produit chimique d'essai n'est pas assez soluble. Les concentrations de DMSO supérieures à 2.5 % sont proscrites car les concentrations de solvant plus élevées interfèrent avec l'essai. Pour les produits chimiques d'essai insolubles dans le DMSO mais solubles dans l'éthanol, on pourra utiliser jusqu'à 2 % d'éthanol dans l'essai sans que cela crée d'interférence.

Témoin avec solution tamponnée:

26. Le témoin avec solution tamponnée (TST) contient tous les éléments de l'essai sauf le solvant et le produit chimique d'essai. Les résultats du TST sont comparés à ceux du témoin avec solvant afin de vérifier que le solvant utilisé ne perturbe pas le système d'essai.

Ligand fort (substance œstrogénique de référence)

27. Le 17 β -œstradiol (CAS 50-28-2) est le ligand endogène qui présente une forte affinité de liaison aux ER de type alpha. Il convient de tracer une courbe de référence pour le 17 β -œstradiol non marqué pour chaque essai de liaison compétitive aux hrER α , afin d'évaluer la variabilité des essais répétés au fil du temps dans le même laboratoire. Huit solutions de 17 β -œstradiol non marqué sont préparées dans du DMSO et de la solution d'essai tamponnée afin d'obtenir les concentrations finales suivantes dans les puits d'essai: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , $10^{-8,5}$, 10^{-9} , $10^{-9,5}$, 10^{-10} et 10^{-11} M. Ces concentrations permettent de tracer la courbe de référence. La concentration maximale de 17 β -œstradiol non marqué (1 μ M) sert également d'indicateur de liaison non spécifique (LNS); elle est donc codée «LNS» dans le tableau 4, même si elle fait également partie de la courbe de référence.

Ligand faible

28. Un ligand faible (noréthynodrel [CAS68-23-5] ou noréthindrone [CAS 68-22-4]) est inclus pour démontrer la sensibilité de chaque expérience et évaluer la variabilité au fil des répétitions de l'essai. Huit solutions de ligand faible sont préparées dans du DMSO et de la solution d'essai tamponnée afin d'obtenir les concentrations finales suivantes dans les puits d'essai: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, 10^{-6} , $10^{-6,5}$, 10^{-7} , $10^{-7,5}$, 10^{-8} et enfin 10^{-9} M.

Non-ligand

29. On fera appel à l'octyltriéthoxysilane (OTES, CAS 2943-75-1) pour servir de témoin négatif (non-ligand). Ce composé permet de vérifier que tel qu'il est mis en œuvre, l'essai détermine les produits chimiques d'essai qui ne se lient pas au hrER α . Huit solutions de non-ligand sont préparées dans du DMSO et de la solution d'essai tamponnée afin d'obtenir les concentrations finales suivantes dans les puits d'essai: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} et 10^{-10} M. Il est aussi possible d'avoir recours au phtalate de dibutyle (DBP, CAS 84-72-2) comme non-ligand, mais en limitant la concentration maximale analysée à 10^{-4} M. En effet, il est attesté que la solubilité maximale du DBP dans l'essai s'élève à 10^{-4} M.

Concentration de hrER α

30. C'est la quantité de récepteur pour laquelle on obtient une liaison spécifique de 40 ± 10 % qui est choisie pour l'essai (voir paragraphes 12–13 de l'appendice 3). La solution de hrER α est préparée par dilution des hrER α fonctionnels dans de la solution d'essai tamponnée glaciale, juste avant son utilisation.

[^{3} H]-17 β -œstradiol

31. La concentration finale de [^{3} H]-17 β -œstradiol dans les puits d'essai doit être 0,5 nM.

Produits chimiques d'essai

32. Un premier essai s'impose pour déterminer la limite de solubilité de chaque produit chimique d'essai ainsi que la fourchette de concentrations qui convient pour l'essai. La limite de solubilité de chaque produit chimique d'essai est d'abord déterminée dans le solvant, puis confirmée dans les conditions de l'essai. La concentration finale utilisée dans l'essai ne doit pas dépasser 1 mM. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur s'effectue avec un témoin du solvant et une série logarithmique d'au moins huit dilutions de la concentration maximale acceptable (p.ex. 1 mM ou moins, selon la limite de solubilité). On relève alors l'apparition d'un trouble ou d'un précipité (voir aussi le paragraphe 35 de l'appendice 3). Dès que l'ordre de grandeur convenant à l'essai est établi, le produit chimique est testé sous forme d'une série de huit concentrations en série logarithmique dont les intervalles sont définis par l'essai de détermination de l'ordre de grandeur précédent. S'il y a lieu, on pourra ajuster plus finement les concentrations testées dans les deuxième et troisième expériences de façon à mieux caractériser la courbe concentration-réponse.
33. Les dilutions du produit chimique d'essai sont préparées dans le solvant approprié (voir paragraphe 25 de l'appendice 3). Si la concentration maximale du produit chimique d'essai n'est soluble ni dans le DMSO, ni dans l'éthanol, et si l'ajout de solvant supplémentaire pouvait se traduire par un dépassement de la concentration maximale de solvant acceptable dans le puits en fin d'essai, c'est la concentration immédiatement inférieure qui fait office de concentration maximale. Le cas échéant, il est possible d'ajouter une concentration

supplémentaire au début de la série de concentrations, les autres concentrations demeurant inchangées.

34. On observera attentivement les puits au moment d'y verser les solutions de produit chimique d'essai, car cet ajout peut provoquer un précipité. Les données relatives à tous les puits qui contiennent un précipité sont exclues de l'ajustement des courbes, et la raison de cette exclusion est consignée.
35. Si d'autres sources fournissent des données sur le $\log(CI_{50})$ d'un produit chimique d'essai, il peut être judicieux de répartir les dilutions géométriquement autour du $\log(CI_{50})$ attendu (p.ex. à 0,5 unité logarithmique). Les résultats finaux doivent correspondre à une fourchette de concentrations suffisamment étendue de part et d'autre du $\log(CI_{50})$, comprenant le «sommet» et la «base» de la courbe de liaison afin de pouvoir la caractériser correctement.

Organisation de la plaque d'essai

36. Les plaques microtitre étiquetées doivent inclure six réplicats respectivement pour le témoin avec solvant, la concentration maximale de substance œstrogénique de référence (E2) servant aussi d'indicateur de liaison non spécifique (LNS) et le témoin avec solution tamponnée, ainsi que les huit concentrations du témoin non ligand (octyltriéthoxysilane), les sept concentrations inférieures de la substance œstrogénique de référence (E2), les huit concentrations du ligand faible (noréthynodrel or noréthindrone) et les huit concentrations de chaque produit chimique d'essai (PCE). Un exemple d'organisation de la plaque d'essai pour obtenir des courbes complètes à partir de toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins est fourni ci-dessous dans le tableau 4. Des plaques microtitre supplémentaires sont utilisées pour le produit chimique d'essai, et comprennent aussi les témoins suivants: (i) une concentration élevée (remplacement maximal) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI_{50}) d'E2 et du ligand faible, en triple exemplaire; (ii) le témoin avec solvant (liaison totale) et les puits pour la LNS, en six réplicats (tableau 5). Un exemple d'organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive de trois produits chimiques d'essai inconnus est disponible dans l'appendice 3.3. Les concentrations indiquées dans cette représentation ainsi que dans les tableaux 4 et 5 font référence aux concentrations finales mises en œuvre dans chaque puits d'essai. La concentration maximale d'E2 doit s'élever à 1×10^{-7} M, tandis que pour le ligand faible, c'est la concentration maximale de la plaque 1 qui est utilisée. Le laboratoire détermine la CI_{50} à partir de sa base de données historiques. Cette valeur doit être similaire à celle observée dans les études de validation (voir tableau 1).

Tableau 4: Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive^{1,2}, courbes concentration-réponse complètes pour la substance œstrogénique de référence et les témoins (plaque 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Témoin avec solution tamponnée et témoin positif (E2)			Témoin faiblement positif (Noréthynodrel)			Témoin négatif (OTES)			LT et LNS		

A	Blanc*	1×10^{-9} M	1×10^{-10} M	LT (témoin du solvant) (2,05% DMSO)
B	E2 (1×10^{-11} M)	1×10^{-8} M	1×10^{-9} M	
C	E2 (1×10^{-10} M)	$1 \times 10^{-7,5}$ M	1×10^{-8} M	LNS (10^{-6} M E2)
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)	1×10^{-7} M	1×10^{-7} M	
E	E2 (1×10^{-9} M)	$1 \times 10^{-6,5}$ M	1×10^{-6} M	Témoin avec solution tamponnée
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)	1×10^{-6} M	1×10^{-5} M	
G	E2 (1×10^{-8} M)	$1 \times 10^{-5,5}$ M	1×10^{-4} M	Blanc (E2 chaud)**
H	E2 (1×10^{-7} M)	$1 \times 10^{-4,5}$ M	1×10^{-3} M	

1 Organisation des échantillons pour la plaque microtitre standard à analyser pour chaque essai.

2 Notez que cette plaque microtitre est préparée avec les dilutions obtenues dans la plaque de dilution conformément aux normes des sections précédentes.

Dans cet exemple, le ligand faible est le noréthynodrel (NE).

* Blanc réel, puits non utilisé.

** Blanc non utilisé pendant l'incubation, mais servant à confirmer la radioactivité totale ajoutée.

Tableau 5: Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive, plaques supplémentaires pour les produits chimiques d'essai (PCE) et les témoins de la plaque.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Produit chimique d'essai-1 (PCE-1)			Produit chimique d'essai-2 (PCE-2)			Produit chimique d'essai-3 (PCE-3)			Témoins		
<i>A</i>	PCE-1 (1×10^{-10} M)			PCE-2 (1×10^{-10} M)			PCE-3 (1×10^{-10} M)			E ₂ (1×10^{-7} M)		
<i>B</i>	PCE-1 (1×10^{-9} M)			PCE-2 (1×10^{-9} M)			PCE-3 (1×10^{-9} M)			E ₂ (IC ₅₀)		
<i>C</i>	PCE-1 (1×10^{-8} M)			PCE-2 (1×10^{-8} M)			PCE-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4.5}$ M)		
<i>D</i>	PCE-1 (1×10^{-7} M)			PCE-2 (1×10^{-7} M)			PCE-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC ₅₀)		
<i>E</i>	PCE-1 (1×10^{-6} M)			PCE-2 (1×10^{-6} M)			PCE-3 (1×10^{-6} M)			LNS (10^{-6} M E ₂)		
<i>F</i>	PCE-1 (1×10^{-5} M)			PCE-2 (1×10^{-5} M)			PCE-3 (1×10^{-5} M)					
<i>G</i>	PCE-1 (1×10^{-4} M)			PCE-2 (1×10^{-4} M)			PCE-3 (1×10^{-4} M)			LT (témoin avec solvant)		
<i>H</i>	PCE-1 (1×10^{-3} M)			PCE-2 (1×10^{-3} M)			PCE-3 (1×10^{-3} M)					

Dans cet exemple, le ligand faible est le noréthynodrel (NE)

Mise en œuvre de l'essai de liaison compétitive

37. Tous les puits, à l'exception de ceux qui servent à déterminer la liaison totale et les puits à blanc (avec le ligand chaud) indiqués dans le tableau 6, reçoivent 50 µl de solution d'essai tamponnée, ensuite mélangée avec 10 µl, selon le cas, de témoin avec solvant, de substance œstrogénique de référence (E2), de ligand faible, de non-ligand et de produit chimique d'essai, puis 10 µl d'une solution de [³H]-17β-œstradiol à 5 nM. En dernier lieu, les puits de chaque plaque reçoivent 30 µl de solution de récepteur glaciale, et sont agités modérément. La solution de hrERα est le dernier réactif ajouté. Les plaques d'essai microtitre sont alors incubées à température ambiante (entre 22 et 28 °C) pendant deux heures.

Tableau 6: Volume des éléments de l'essai de liaison compétitive au hrER, plaques microtitre

<i>Étapes de préparation par colonne</i>		Puits autres que LT	Puits LT	Blanc (E2 chaud)
Volume d'éléments à verser dans le puits d'essai, et ordre d'ajout	Solution d'essai tamponnée à température ambiante	50 µl	60 µl	90 µl
	E2 non marqué, ligand faible, non- ligand, solvant et produits chimiques d'essai*	10 µl	-	
	[³ H]-17β-œstradiol en quantité suffisante pour une concentration finale de 0,5 nM (soit 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	Concentration de hrERα préétablie (voir paragraphes 12-13)	30 µl	30 µl	
Volume total dans chaque puits d'essai		100 µl	100 µl	100 µl

* Préparés manière à obtenir une concentration finale de solvant acceptable

38. Le [³H]-17β-œstradiol lié au hrERα est séparé du [³H]-17β-œstradiol libre en ajoutant 100 µl d'une suspension glaciale de DCC dans chaque puits, puis quantifié en suivant la méthode décrite dans les paragraphes 21-23 de l'appendice 3 relativement à l'essai de liaison à saturation.

39. Les puits G10 à G12 et H10 à H12 («blanc (E2 chaud)» dans le tableau 4) fournissent les désintégrations par minute du [³H]-17β-œstradiol dans 10 µl Les aliquotes de 10 µl sont versées directement dans le scintillateur liquide.

Critères d'acceptabilité

Essai de liaison à saturation

40. La courbe de liaison spécifique doit atteindre un plateau pour les concentrations les plus élevées de [³H]-17β-œstradiol, le cas échéant, ce qui traduit la saturation des hrERα avec le ligand.

41. Il faut que la liaison spécifique induite par le [³H]-17β-œstradiol à 0,5 nM corresponde à une radioactivité égale à 30 à 50 % de la moyenne de la radioactivité totale mesurée dans tous les essais. On peut occasionnellement admettre quelques valeurs en dehors de cette fourchette, mais si les résultats de l'essai la dépassent régulièrement ou si un essai donné

livre des résultats très éloignés de cette fourchette, il convient d'ajuster la concentration de protéine et de répéter l'essai de liaison à saturation.

42. Les données doivent aboutir à une représentation de Scatchard linéaire.

43. La liaison non spécifique ne doit pas être excessive: elle est généralement inférieure à 35 % de la liaison totale. Le ratio de ces liaisons pourra néanmoins parfois dépasser ce chiffre s'agissant de mesurer des désintégrations par minutes très faibles pour la concentration d'essai de 17β -œstradiol radiomarqué la plus basse.

Essai de liaison compétitive

44. Des concentrations croissantes de 17β -œstradiol non marqué doivent déplacer le [^3H]- 17β -œstradiol des récepteurs selon un modèle de liaison compétitive sur un seul site.

45. Il faut que la CI_{50} de la substance œstrogénique de référence (le 17β -œstradiol) soit environ égale à la concentration molaire de [^3H]- 17β -œstradiol plus la K_d établie grâce à l'essai de liaison à saturation.

46. La liaison spécifique totale doit rester cohérente et s'élever à 40 ± 10 % lorsque la concentration moyenne de la radioactivité totale ajoutée à chaque puits vaut 0.5 nM pour tous les essais. On peut occasionnellement admettre quelques valeurs en dehors de cette fourchette, mais si les résultats de l'essai la dépassent régulièrement ou si un essai donné livre des résultats très éloignés de cette fourchette, il convient d'ajuster la concentration de protéine.

47. Le solvant ne doit pas modifier la sensibilité ou la reproductibilité de l'essai. Les résultats du témoin avec solvant (puits TS) sont comparés à ceux du témoin avec solution tamponnée (TST) afin de vérifier que le solvant utilisé ne perturbe pas le système d'essai. Quand le solvant n'a aucun effet sur l'essai, les résultats correspondant au TS et au TST sont comparables.

48. Le non-ligand ne doit pas remplacer plus de 25 % du [^3H]- 17β -œstradiol lié au hrER α à des concentrations allant jusqu'à 10^{-3} M (OTES) ou 10^{-4} M (DBP).

49. Des critères de performance ont été définis pour la substance œstrogénique de référence et pour les deux ligands faibles (p.ex. noréthynodrel ou noréthindrone) à partir des données de l'étude de validation de l'essai de liaison au hrER du CERI (annexe N de la référence 2). Les intervalles de confiance à 95 % fournis découlent des valeurs moyennes $\pm$ ET (n) obtenues dans l'ensemble des essais sur les témoins effectués par quatre laboratoires participant à l'étude de validation. Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés pour les paramètres d'ajustement des courbes (p.ex. sommet, base, pente de Hill et $\log\text{CI}_{50}$) correspondant à la substance œstrogénique de référence et aux ligands faibles ainsi que pour le $\log_{10}\text{ALR}$ des ligands faibles par rapport à la substance œstrogénique de référence. Le tableau 1 présente les fourchettes attendues pour les paramètres d'ajustement des courbes, qui peuvent faire office de critères de performance. En pratique, la fourchette de la

CI₅₀ peut varier légèrement en fonction de la K_d déduite de la préparation de récepteurs déterminée par les expériences et en fonction de la concentration d'essai du ligand.

50. Aucun critère de performance n'a été établi pour les paramètres d'ajustement des courbes correspondant aux produits chimiques d'essai du fait de la grande diversité des composés potentiellement testés ainsi que des affinités et résultats correspondants (p.ex. ajustement complet, partiel ou nul des courbes). On fera toutefois appel à un avis professionnel pour analyser les résultats de chaque essai sur une substance. Il convient d'avoir recours à une fourchette de concentrations d'essai suffisante pour définir clairement le sommet de la courbe de liaison compétitive (p.ex. pour induire 90 à 100 % de liaison). La variabilité entre les réplicats de chaque concentration du produit chimique d'essai et entre les trois essais non simultanés doit rester raisonnable et défendable sur le plan scientifique. Il est nécessaire que les témoins utilisés pour chaque essai sur un produit chimique d'essai soient proches des mesures de la performance documentées pour cet essai du CERI, et en harmonie avec les données historiques obtenues pour les témoins par chaque laboratoire.

ANALYSE DES DONNÉES

Essai de liaison à saturation

51. Cet essai mesure la liaison totale et la liaison non spécifique. Ces valeurs permettent de calculer la liaison spécifique induite par des concentrations croissantes de [³H]-17β-œstradiol à l'équilibre, en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale. La courbe reportant la liaison spécifique en fonction de la concentration de [³H]-17β-œstradiol doit atteindre un plateau pour la liaison spécifique maximale, qui indique la saturation des hrERα par le [³H]-17β-œstradiol. De plus, l'analyse des données documente la liaison du [³H]-17β-œstradiol à un site de liaison unique à haute affinité. Il faut que la courbe de liaison à saturation présente les liaisons non spécifique, totale et spécifique. Une régression non linéaire (p.ex. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) permet d'approfondir l'analyse des données, et les résultats sont finalement présentés sous forme d'une représentation de Scatchard.
52. L'analyse des données doit déterminer la B_{max} et la K_d en se fondant uniquement sur les données de liaison totale, étant supposé que la liaison non spécifique est linéaire, à moins de justifier le recours à une autre méthode. Par ailleurs, on détermine le meilleur ajustement des courbes à l'aide d'une analyse de régression solide, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. La méthode choisie pour cette analyse de régression solide sera indiquée. On appliquera toujours une correction relative à la perte de ligand (p.ex. avec la méthode de Swillens, 1995) pour déterminer la B_{max} et la K_d à partir des données de liaison à saturation.

Essai de liaison compétitive

53. La courbe de liaison compétitive représente la liaison spécifique du [³H]-17β-œstradiol en fonction de la concentration (en log₁₀) du compétiteur. La concentration de produit

chimique d'essai qui inhibe 50 % de liaison spécifique maximale du [^3H]-17 β -œstradiol correspond à la CI_{50} .

54. Des estimations des $\log(\text{CI}_{50})$ des témoins positifs (p.ex. substance œstrogénique de référence et ligand faible) sont obtenues grâce à un logiciel approprié d'ajustement de courbe par méthode non linéaire d'après une équation de Hill à quatre paramètres (p.ex. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). Ces ajustements se font sans imposer de limites au sommet, à la base, à la pente et au $\log(\text{CI}_{50})$ des courbes. Le meilleur ajustement des courbes est établi grâce à une analyse de régression solide, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. Aucune correction n'est effectuée pour la perte de ligand. Après l'analyse initiale, chaque courbe de liaison est examinée pour vérifier qu'elle est bien ajustée au modèle. L'affinité de liaison relative (ALR) du ligand faible est exprimée en pourcentage à partir du rapport entre le $\log(\text{CI}_{50})$ du ligand faible et le $\log(\text{CI}_{50})$ du 17 β -œstradiol. Les résultats des témoins positifs et du témoin non ligand sont évalués à partir des mesures de la performance de l'essai indiquées dans les paragraphes 44-49 de l'appendice 3.
55. Les données obtenues pour tous les produits chimiques d'essai doivent être analysées par étape pour veiller à l'évaluation appropriée des résultats et à la classification correcte de chaque courbe de liaison compétitive. Ainsi, pour chaque essai sur une substance, il est d'abord recommandé d'effectuer une analyse des données normalisée identique à celle utilisée pour la substance œstrogénique de référence et les témoins avec ligand de faible affinité (voir paragraphe 54 de l'appendice 3). Cette étape est suivie d'un examen technique de l'ajustement des paramètres de la courbe et d'un examen visuel pour déterminer dans quelle mesure les données correspondent à la courbe de liaison compétitive obtenue pour chaque essai. Cet examen technique repose sur trois observations indiquant que l'essai et les analyses ont été réalisés correctement: une baisse du pourcentage de [^3H]-17 β -œstradiol lié aux sites spécifiques en fonction de la concentration, une faible variabilité entre les réplicats techniques de chaque concentration de produit chimique d'essai et la cohérence des paramètres d'ajustement entre les trois essais.

Interprétation des données

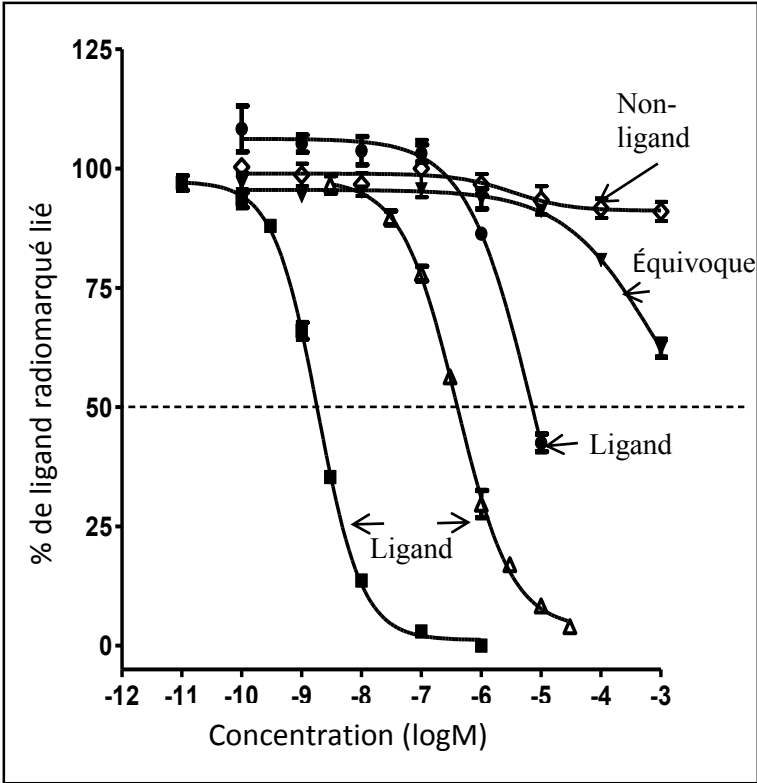
56. Sous réserve du respect de l'ensemble des critères d'acceptabilité, un produit chimique d'essai est considéré comme ligand du hrER α si sa courbe de liaison peut être ajustée et si le point le plus bas de la courbe de réponse obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison inférieure à 50 % (graphique 1).
57. Sous réserve du respect de l'ensemble des critères d'acceptabilité, un produit chimique d'essai est considéré comme non-ligand du hrER α si:
- sa courbe de liaison peut être ajustée et si le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison supérieure à 75 %, ou
 - sa courbe de liaison ne peut pas être ajustée et si la moyenne des pourcentages de liaison non lissés de tous les groupes de concentration de l'essai est supérieure à 75 %.

58. Les produits chimiques d'essai sont considérés comme équivoques si aucune des conditions qui précèdent n'est satisfaite (p.ex. le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée correspond à une liaison située entre 76 et 51 %).

Tableau 7: Critères de classification d'un produit chimique d'essai fondée sur sa courbe de liaison compétitive.

Classification	Critères
Ligand ^a	Il est possible d'ajuster la courbe. Le point le plus bas de la courbe de réponse obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison inférieure à 50 %.
Non-ligand ^b	S'il est possible d'ajuster la courbe, - le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison supérieure à 75 %. S'il n'est pas possible d'ajuster la courbe, - la moyenne des pourcentages de liaison non lissés de tous les groupes de concentration de l'essai est supérieure à 75 %.
Équivoque ^c	Essai évaluable qui ne peut être classé ni comme ligand, ni comme non-ligand (P.ex. le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée correspond à une liaison située entre 76 et 51 %.)

Graphique 1. Exemples de classification d'un produit chimique d'essai grâce à la courbe de liaison compétitive.



59. Les différents essais réalisés par un laboratoire sur une substance sont combinés en attribuant des valeurs numériques à chaque essai et en calculant la moyenne de ces valeurs, comme l’indique le tableau 8. Les résultats combinés des essais de chaque laboratoire sont alors comparés à la classification attendue pour chaque produit chimique d'essai.

Tableau 8: Méthode de classification d'un produit chimique d'essai à partir de plusieurs essais dans un même laboratoire

Attribution d'une valeur à chaque essai:	
Classification	Valeur numérique
Ligand	2
Équivoque	1
Non-ligand	0
Classification selon la moyenne des valeurs numériques de toutes les expériences:	
Classification	Valeur numérique
Binder	Moyenne $\geq 1,5$
Equivoque	$0,5 \leq \text{moyenne} < 1,5$
Non-binder	Moyenne $< 0,5$

RAPPORT D'ESSAI

60. Voir le paragraphe 24 de la partie «ÉLÉMENTS DE L'ESSAI DE LIAISON AU hrER» de la présente méthode d'essai.

Appendice 3.1

LIST DE TERMES

[³H]E₂: 17β-œstradiol radiomarké au tritium

DCC: *dextran-coated charcoal* (charbon enrobé de dextrane)

E₂: 17β-œstradiol non marqué (inerte)

Solution d'essai tamponnée: solution de 10 mM de Tris-HCl à pH 7.4, avec 1 mM d'EDTA, 1 mM d'EGTA, 1 mM de NaVO₃, 10 % de glycérol, 0,2 mM de leupeptine, 1 mM de dithiothréitol et 10 mg/ml d'albumine sérique bovine

hrERα: récepteur des œstrogènes alpha recombinant humain (domaine de liaison du ligand)

Réplicat: un des multiples puits qui contiennent les mêmes éléments, aux mêmes concentrations, et sont testés simultanément dans un même essai. Le présent protocole prévoit que chaque concentration du produit chimique d'essai soit soumise à l'essai en triple exemplaire, c'est-à-dire que trois réplicats de chacune d'elle sont testés simultanément.

Essai: série complète d'expériences simultanées dans les puits d'une plaque microtitre livrant l'ensemble des données nécessaires pour caractériser l'affinité de liaison au hrERα d'un produit chimique d'essai, soit la quantité totale de [³H]-17β-œstradiol ajoutée dans un puits, la liaison maximale au hrERα du [³H]-17β-œstradiol, la liaison non spécifique et la liaison totale pour diverses concentrations de le produit chimique d'essai. Un essai peut reposer sur un seul puits d'essai (réplicat) par concentration, mais dans la mesure où le présent protocole exige des expériences en triple exemplaire, un essai fait appel à trois puits d'essai par concentration. De plus, le présent protocole impose de réaliser trois essais indépendants (non simultanés) par produit chimique.

Appendice 3.2

ORGANISATION DES PUITS POUR L'ESSAI DE LIAISON COMPÉTITIVE

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de la solution mère hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
S	A1	1	Blanc	B	B1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Blanc	B	B2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Blanc	B	B3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	E2 froid	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B2	2	E2 froid	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B3	3	E2 froid	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	C1	1	E2 froid	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C2	2	E2 froid	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C3	3	E2 froid	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	D1	1	E2 froid	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D2	2	E2 froid	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D3	3	E2 froid	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	E1	1	E2 froid	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E2	2	E2 froid	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E3	3	E2 froid	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	F1	1	E2 froid	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F2	2	E2 froid	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F3	3	E2 froid	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	G1	1	E2 froid	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G2	2	E2 froid	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G3	3	E2 froid	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	H1	1	E2 froid	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H2	2	E2 froid	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H3	3	E2 froid	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	A4	1	noréthynodrel	NE	LF1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A5	2	noréthynodrel	NE	LF1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A6	3	noréthynodrel	NE	LF1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B4	1	noréthynodrel	NE	LF2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B5	2	noréthynodrel	NE	LF2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B6	3	noréthynodrel	NE	LF2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C4	1	noréthynodrel	NE	LF3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C5	2	noréthynodrel	NE	LF3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C6	3	noréthynodrel	NE	LF3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	D4	1	noréthynodrel	NE	LF4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D5	2	noréthynodrel	NE	LF4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D6	3	noréthynodrel	NE	LF4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E4	1	noréthynodrel	NE	LF5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E5	2	noréthynodrel	NE	LF5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E6	3	noréthynodrel	NE	LF5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	F4	1	noréthynodrel	NE	LF6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F5	2	noréthynodrel	NE	LF6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F6	3	noréthynodrel	NE	LF6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	G4	1	noréthynodrel	NE	LF7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G5	2	noréthynodrel	NE	LF7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G6	3	noréthynodrel	NE	LF7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06

Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaques	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur(M)	Volume de la solution mère de hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur (E2 chaud) (µl)	Volume issu de la plaque de dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
S	H4	1	noréthynodrel	NE	LF8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H5	2	noréthynodrel	NE	LF8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H6	3	noréthynodrel	NE	LF8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	A10	1	liaison totale	LT	LT1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	liaison totale	LT	LT2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	liaison totale	LT	LT3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	liaison totale	LT	LT4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	liaison totale	LT	LT5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	liaison totale	LT	LT6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	E2 froid (élevé)	LNS	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C11	2	E2 froid (élevé)	LNS	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C12	3	E2 froid (élevé)	LNS	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D10	4	E2 froid (élevé)	LNS	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D11	5	E2 froid (élevé)	LNS	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D12	6	E2 froid (élevé)	LNS	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E10	1	Témoin tampon	TST	TST1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	Témoin tampon	TST	TST2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	Témoin tampon	TST	TST3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	Témoin tampon	TST	TST4	-	-	100	-	-	100	-
S	F11	5	Témoin tampon	TST	TST5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	Témoin tampon	TST	TST6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10*	1	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11*	2	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12*	3	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11*	5	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H6	-	90	-	10	-	100	-

*: Veuillez noter que les puits codés «chaud» sont vides pendant l'incubation. Les 10 µl qui y sont ensuite ajoutés ne servent qu'au comptage

par scintillation..

Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de la solution mère de hrER (µl)	Volume de la solution tamponnée (µl)	Volume du traceur E2 chaud (µl)	Volume issu de la plaque de dilution (µl)	Volume final (µl)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	A1	1	Inconnu 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A2	2	Inconnu 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A3	3	Inconnu 1	U1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B1	1	Inconnu 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B2	2	Inconnu 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B3	3	Inconnu 1	U1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C1	1	Inconnu 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C2	2	Inconnu 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C3	3	Inconnu 1	U1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D1	1	Inconnu 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D2	2	Inconnu 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D3	3	Inconnu 1	U1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E1	1	Inconnu 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E2	2	Inconnu 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E3	3	Inconnu 1	U1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F1	1	Inconnu 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F2	2	Inconnu 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F3	3	Inconnu 1	U1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G1	1	Inconnu 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G2	2	Inconnu 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G3	3	Inconnu 1	U1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H1	1	Inconnu 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H2	2	Inconnu 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H3	3	Inconnu 1	U1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A4	1	Inconnu 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A5	2	Inconnu 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A6	3	Inconnu 2	U2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B4	1	Inconnu 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B5	2	Inconnu 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B6	3	Inconnu 2	U2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C4	1	Inconnu 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C5	2	Inconnu 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C6	3	Inconnu 2	U2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D4	1	Inconnu 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D5	2	Inconnu 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D6	3	Inconnu 2	U2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E4	1	Inconnu 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E5	2	Inconnu 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E6	3	Inconnu 2	U2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F4	1	Inconnu 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F5	2	Inconnu 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F6	3	Inconnu 2	U2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G4	1	Inconnu 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G5	2	Inconnu 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G6	3	Inconnu 2	U2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H4	1	Inconnu 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H5	2	Inconnu 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H6	3	Inconnu 2	U2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03

Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaques	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de solution hrER (μL)	Volume de solution (μL)	Volume du traceur (E2) (μL)	Volume fissa de la plaque dilution (μL)	Volume final (μL)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	A7	1	Inconnu 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A8	2	Inconnu 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A9	3	Inconnu 3	U3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B7	1	Inconnu 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B8	2	Inconnu 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B9	3	Inconnu 3	U3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C7	1	Inconnu 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C8	2	Inconnu 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C9	3	Inconnu 3	U3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D7	1	Inconnu 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D8	2	Inconnu 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D9	3	Inconnu 3	U3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E7	1	Inconnu 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E8	2	Inconnu 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E9	3	Inconnu 3	U3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F7	1	Inconnu 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F8	2	Inconnu 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F9	3	Inconnu 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G7	1	Inconnu 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	Inconnu 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	Inconnu 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	Inconnu 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	Inconnu 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	Inconnu 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	Témoin E2 (max)	S	E2max1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Témoin E2 (max)	S	E2max2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Témoin E2 (max)	S	E2max3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Témoin E2 (CI50)	S	E2CI501	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2CI50
P1	B11	2	Témoin E2 (CI50)	S	E2CI502	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2CI50
P1	B12	3	Témoin E2 (CI50)	S	E2CI503	E2IC50x10	30	50	10	10	100	E2CI50
P1	C10	1	Témoin NE (max)	S	NEmax1	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C11	2	Témoin NE (max)	S	NEmax2	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C12	3	Témoin NE (max)	S	NEmax3	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	D10	1	Témoin NE	S	NECI501	NECI50 x10	30	50	10	10	100	NECI50
P1	D11	2	Témoin NE	S	NECI502	NECI50 x10	30	50	10	10	100	NECI50
P1	D12	3	Témoin NE	S	NECI503	NECI50 x10	30	50	10	10	100	NECI50
P1	E10	1	E2 froid (élevé)	LNS	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E11	2	E2 froid (élevé)	LNS	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E12	3	E2 froid (élevé)	LNS	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F10	4	E2 froid (élevé)	LNS	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F11	5	E2 froid (élevé)	LNS	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F12	6	E2 froid (élevé)	LNS	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	G10	1	liaison totale	LT	LT1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	liaison totale	LT	LT2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	liaison totale	LT	LT3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	liaison totale	LT	LT4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	liaison totale	LT	LT5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	liaison totale	LT	LT6	-	30	60	10	-	100	-

Appendice 4

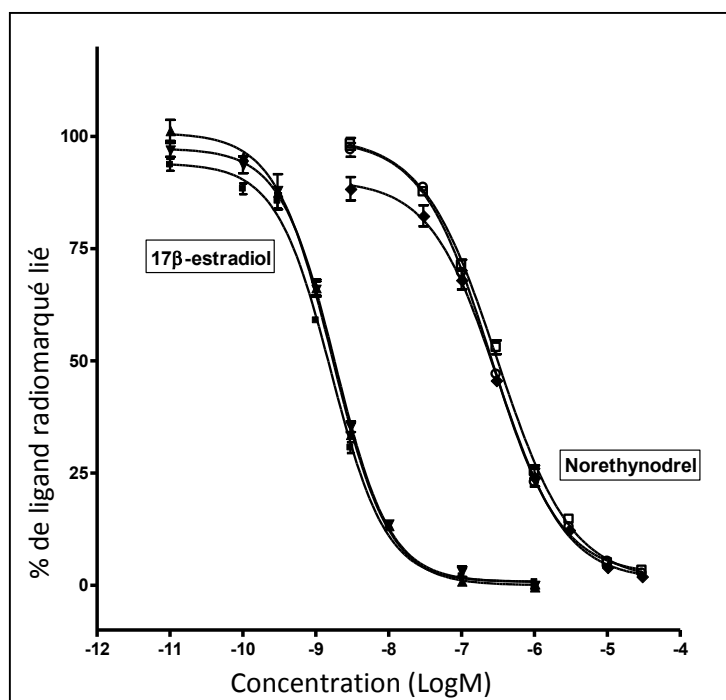
OBSERVATIONS RELATIVES À L'ANALYSE DES DONNÉES DE L'ESSAI DE LIAISON COMPÉTITIVE AU HRER

1. L'essai de liaison compétitive au hrER α mesure la liaison d'une concentration fixe de [^{3} H]-17 β -œstradiol en présence de concentrations croissantes de produit chimique d'essai. La courbe de liaison compétitive présente la liaison spécifique du [^{3} H]-17 β -œstradiol en fonction de la concentration (en log₁₀) du compétiteur. La concentration de produit chimique d'essai qui inhibe 50 % de la liaison spécifique maximale du [^{3} H]-17 β -œstradiol correspond à la CI₅₀.

Analyse des données obtenues pour la substance œstrogénique de référence et le ligand faible (1)

2. Les données des essais sur les témoins sont transformées (en pourcentage de liaison spécifique du [^{3} H]-17 β -œstradiol et logarithme de la concentration de la substance témoin) pour les analyses ultérieures. Des estimations des log(CI₅₀) des témoins positifs (p.ex. substance œstrogénique de référence et ligand faible) sont obtenues grâce à un logiciel approprié d'ajustement de courbe par méthode non linéaire d'après une équation de Hill à quatre paramètres (p.ex. BioSoft; GraphPad Prism) (2). Ces ajustements se font généralement sans imposer de limites au sommet, à la base, à la pente et au log(CI₅₀) des courbes. Le meilleur ajustement des courbes est établi grâce à une solide analyse de régression, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. La méthode choisie pour cette solide analyse de régression sera indiquée. Les essais de liaison au hrER de FW et du CERI ne requièrent pas de correction relative à la perte de ligand, mais il est possible d'y avoir recours, s'il y a lieu. Après l'analyse initiale, chaque courbe de liaison est examinée pour vérifier qu'elle est bien ajustée au modèle. L'affinité de liaison relative (ALR) du ligand faible peut être exprimée en pourcentage à partir du rapport entre le log(CI₅₀) du ligand faible et le log(CI₅₀) du 17 β -œstradiol. Les résultats obtenus pour les témoins positifs et négatifs doivent être évalués à l'aide des critères de performance de l'essai et d'acceptabilité décrits dans la présente méthode d'essai (paragraphe 20), dans l'appendice 2 (essai de FW, paragraphes 41-51) et dans l'appendice 3 (essai du CERI, paragraphes 41-51). Des exemples illustrant trois essais sur la substance œstrogénique de référence et le ligand faible sont présentés dans le graphique 1.

Graphique 1. Exemples de courbes de liaison compétitive pour la substance œstrogénique de référence et le ligand faible témoin.

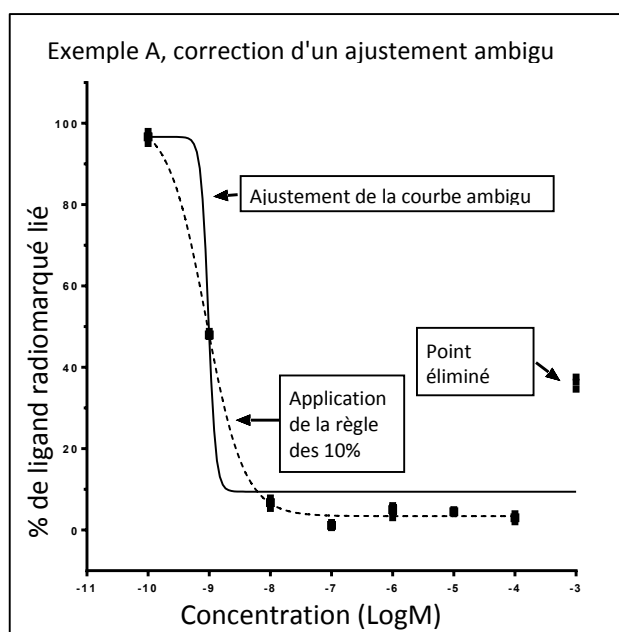


Analyse des données des produits chimiques d'essai

- Les données obtenues pour tous les produits chimiques d'essai doivent être analysées par étape pour veiller à l'évaluation appropriée des résultats et à la classification correcte de chaque courbe de liaison compétitive. Chaque essai sur un produit chimique d'essai donne d'abord lieu à une analyse des données normalisée identique à celle qui est utilisée pour la substance œstrogénique de référence et les témoins avec ligand de faible affinité. Cette étape est suivie d'un examen technique de l'ajustement des paramètres de la courbe et d'un examen visuel pour déterminer dans quelle mesure les données correspondent à la courbe de liaison compétitive obtenue pour chaque essai. Cet examen technique repose sur trois observations indiquant que l'essai et les analyses ont été réalisés correctement : une baisse du pourcentage de [^3H]-17β-œstradiol lié aux sites spécifiques en fonction de la concentration, une faible variabilité entre les réplicats techniques de chaque concentration de produit chimique d'essai et la cohérence des paramètres d'ajustement entre les trois essais. On fera appel à un avis professionnel pour examiner les résultats de chaque essai d'un produit chimique d'essai, et les données utilisées pour classer un produit chimique d'essai comme ligand ou non-ligand doivent être défendables sur le plan scientifique.
- Il peut arriver que certaines expériences exigent une attention supplémentaire pour analyser et interpréter convenablement les données de liaison au hrER. En effet, des études attestent que dans certains cas, l'analyse et l'interprétation des données de liaison

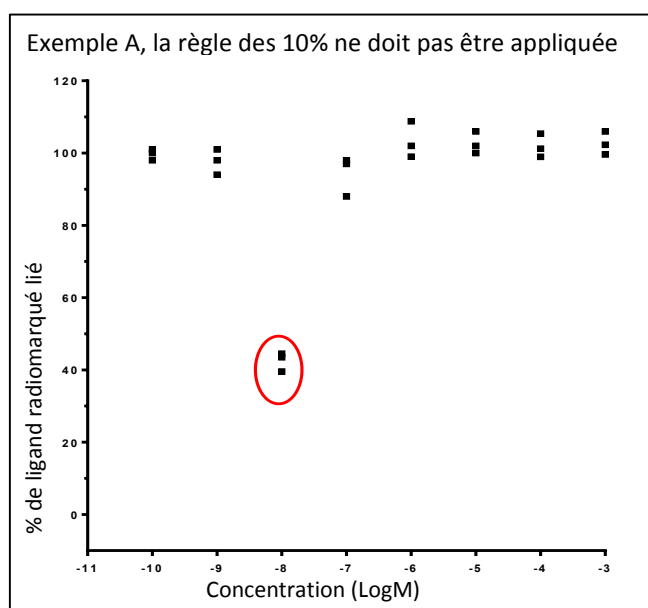
compétitive au récepteur peuvent être compliquées par une remontée du pourcentage de liaison spécifique pour les concentrations d'essai les plus élevées (graphique 2). Ce problème bien connu est survenu pendant la mise en œuvre des protocoles dans plusieurs essais de liaison compétitive au récepteur (3). Dans ce genre de situation, la réponse dépend de la concentration à basse concentration, mais lorsque cette dernière approche de la limite de solubilité, le [^3H]-17 β -œstradiol cesse d'être remplacé par le produit chimique d'essai. Le cas échéant, les données obtenues pour les concentrations élevées indiquent que la limite biologique de l'essai est atteinte. Par exemple, ce phénomène est souvent associé à une insolubilité chimique et à une précipitation à forte concentration; il peut aussi traduire un dépassement de la capacité du DCC à piéger le ligand radiomarqué libre pendant la procédure de séparation, pour les concentrations d'essai les plus élevées. Conserver ces points lors de l'ajustement des données de liaison compétitive à une courbe sigmoïde pourrait entraîner une mauvaise classification de l'affinité de liaison aux ER du produit chimique d'essai (graphique 2). Pour éviter cette situation, le protocole des essais de liaison au hrER de FW et du CERI permet d'exclure des points de données de l'analyse lorsque la moyenne du pourcentage de liaison spécifique du [^3H]-17 β -œstradiol pour tous les réplicats dépasse d'au moins 10 % la moyenne de la liaison observée à une concentration inférieure. Cette règle communément appelée «règle des 10 %» ne peut être appliquée qu'une seule fois par courbe, et l'analyse doit se faire à partir des données de six concentrations au minimum afin de classer la courbe correctement.

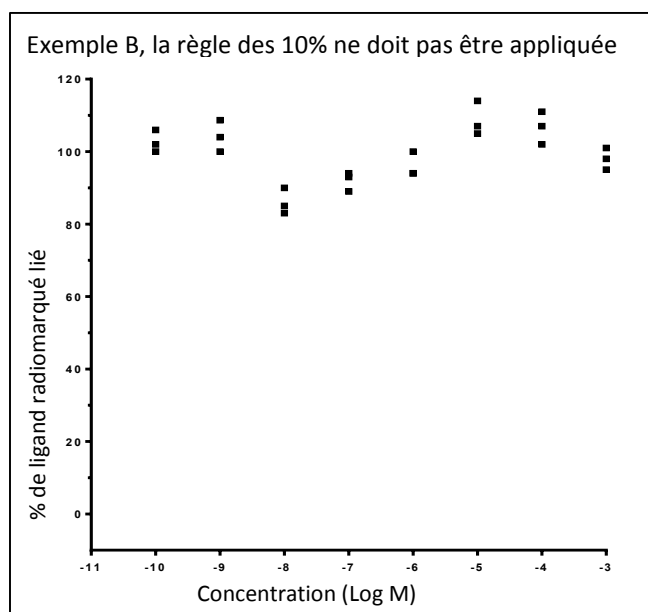
Graphique 2: Exemples de courbes de liaison compétitive avec ou sans application de la règle des 10 %.



5. On examinera prudemment s'il convient d'appliquer la règle des 10 % pour corriger les courbes concernées, règle réservée aux substances chimiques qui ont de fortes chances d'être des ligands du hrER. Au fil des expériences de l'étude de validation de l'essai de liaison au hrER de FW, il a été relevé que la règle des 10 % pouvait avoir des conséquences involontaires et inattendues. En effet, des produits chimiques n'interagissant pas avec le récepteur (donc non-ligands) affichaient souvent une variabilité supérieure à 10 % sur toute la fourchette de concentrations d'essai quand la liaison du ligand radiomarqué était proche de 100 %. Si la liaison la plus basse correspondait à une faible concentration, l'application de la règle des 10 % pouvait entraîner l'élimination des données obtenues pour toutes les concentrations supérieures, bien qu'elles puissent servir à démontrer que le produit chimique d'essai est un non-ligand. Le graphique 3 présente des exemples dans lesquels il ne faut pas appliquer la règle des 10 %.

Graphique 3: Exemples de courbes de liaison compétitive dans lesquelles il ne faut pas appliquer la règle des 10 %.





Références

- (1) OCDE (2015), Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Série sur les essais et évaluations n°226, OCDE, Paris.
- (2) Motulsky H. et Christopoulos A. (2003), The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression. GraphPad Software Inc., San Diego (Californie), p. 187-191. Disponible à l'adresse:
[www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf]]
- (3) Laws S.C., Yavanhxay S., Cooper R.L., Eldridge J.C. (2006), Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors. *Toxicological Sci.* 94(1): p. 46-56.