



**Section 4**  
**Effets sur la santé**

**Essai n° 444A:**  
Immunotoxicité *in vitro*

*Essai II 2 Luc*

4 juillet 2023

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



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

## Immunotoxicité In Vitro : Essai II 2 Luc

### REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

1. On appelle immunotoxicologie l'étude des effets indésirables qui se produisent sur tout élément constitutif du système immunitaire en réponse à l'exposition à des médicaments ou à des produits chimiques (1). L'immunotoxicologie peut également porter sur les effets indésirables qui, médiés par des cellules ou des molécules du système immunitaire, sont observés sur différents organes et tissus. Le système immunitaire est sensible à l'action de produits toxiques pour les raisons suivantes notamment : 1) la nécessité de maintenir l'équilibre délicat entre son activation, sa régulation et son inhibition ; 2) sa dépendance vis-à-vis de la régénération des cellules à partir de cellules souches hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse ; 3) la nécessité d'une expansion clonale des lymphocytes T et B par prolifération cellulaire pendant la réponse adaptative ; 4) la nécessité de maintenir un nombre adéquat de lymphocytes, notamment les populations de lymphocytes effecteurs, mémoires et naïfs.

2. L'immunotoxicité causée par des médicaments ou par des produits chimiques peut prendre diverses formes, notamment la dérégulation de la réponse immunitaire, laquelle peut provoquer une immunosuppression ou une stimulation inadaptée du système immunitaire. Dans ce dernier cas, il peut y avoir stimulation excessive du système immunitaire, inflammation prolongée, réactions d'hypersensibilité et maladies auto-immunes. Lorsqu'on parle d'immunotoxicité induite par un produit chimique, l'effet observé peut aller dans un ou plusieurs sens, car la même substance peut provoquer une immunosuppression ou une stimulation du système immunitaire en fonction de la dose et de la cible cellulaire. Il serait donc plus approprié de définir comme substance immunotoxique tout agent susceptible de modifier une ou plusieurs fonctions immunitaires de sorte qu'un effet indésirable est observé chez l'organisme hôte. L'accent est mis non pas tant sur le sens de l'effet que sur sa conséquence. Pour cette raison, les termes « immunotoxique » et « immunotoxicité » sont utilisés dans la présente Ligne directrice (LD), en toute cohérence avec le document d'examen détaillé sur l'immunosuppression produit par l'OCDE (2).

3. Dans le cadre du programme de l'OCDE visant à mettre au point des voies toxicologiques impliquées dans les effets indésirables (*Adverse Outcome Pathway*, AOP), l'AOP 154 sur l'inhibition de l'activité de la calcineurine induisant une déficience dans la production d'anticorps T-dépendante (« Inhibition of Calcineurin Activity Leading to Impaired T-Cell Dependent Antibody Response ») a été approuvée en 2021 (3). Cette AOP décrit l'inhibition de l'activité de la calcineurine (CN) par liaison d'agents stressants appelés inhibiteurs de la CN (ICN). Les ICN se lient à la CN grâce à leurs immunophilines propres, ce qui vient interférer avec la localisation nucléaire du facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT), une cible de la CN. Ce défaut de localisation nucléaire conduit à la réduction de la formation de complexes fonctionnels entre NFAT et la protéine d'activation 1 (AP-1) – qui se lie normalement aux sites des promoteurs d'IL 2, d'IL 4 et d'autres cytokines dérivées des lymphocytes T – et, ainsi, à la réduction de la production de ces cytokines. Parmi les cytokines affectées dans chaque sous-population

de lymphocytes T auxiliaires (Th), on compte IL 2 et IL 4, dont la baisse de production a une incidence négative sur la prolifération et sur la différenciation des lymphocytes B, ce qui inhibe la production d'anticorps T-dépendante.

4. IL 2 exerce une action pléiotropique sur la différenciation des lymphocytes T CD4+ grâce à sa capacité de modulation de l'expression des récepteurs de cytokines. Elle promeut la différenciation des lymphocytes Th1 en induisant la production d'IL 12R $\beta$ 2 (et d'IL 12R $\beta$ 1), elle promeut la différenciation des lymphocytes Th2 en induisant la production d'IL 4R $\alpha$ , elle inhibe la différenciation des lymphocytes Th17 en inhibant la production de gp130 (et d'IL 6R $\alpha$ ) et elle détermine la différenciation des lymphocytes T régulateurs en induisant la production d'IL 2R $\alpha$ . Elle est aussi un suppresseur puissant de la production d'IL 7R $\alpha$ , ce qui entraîne une réduction des signaux de survie qui promeuvent en temps normal la survie cellulaire et le développement de cellules mémoires (4). Il est donc envisageable que les produits chimiques qui affectent la libération d'IL 2 par les lymphocytes T puissent avoir une incidence significative sur la fonction immunitaire.

5. L'essai IL 2 avec luciférase (essai IL 2 Luc) exploite des cellules 2H4 pour identifier les effets des produits chimiques sur les promoteurs IL 2 et IFN- $\gamma$  en présence des activateurs 13-acétate-12-myristate de phorbol (PMA) et ionomycine (Io) (5). Les cellules 2H4, dérivées de cellules Jurkat, renferment une luciférase verte stable (*Stable Luciferase Green*, SLG) placée sous le contrôle du promoteur d'IL 2, une luciférase orange stable (*Stable Luciferase Orange*, SLO) sous le contrôle du promoteur d'interféron (IFN)- $\gamma$  et une luciférase rouge stable (*Stable Luciferase Red*, SLR) sous le contrôle du promoteur de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Par rapport aux méthodes qui mesurent directement l'IL 2 et l'IFN produits par les cellules Jurkat, l'essai IL 2 Luc nécessite beaucoup moins de manipulations et un temps d'essai sensiblement plus court. En particulier, il ne requiert comme manipulations que la dilution des produits chimiques et la préparation des solutions de produits chimiques et des cellules. En outre, on peut mesurer la quantité d'IL 2 et d'IFN par la méthode ELISA, mais pas la quantité de GAPDH.

6. La méthode IL 2 Luc a fait l'objet d'une étude de validation menée par une équipe de gestion de la validation, composée d'un laboratoire principal, de trois laboratoires indépendants et de quatre membres experts internationaux et coordonnée par le Centre japonais de validation des méthodes alternatives (JaCVAM). Cette étude de validation a rempli les critères d'acceptabilité relatifs aux reproductibilités intralaboratoire (80.0 %, 4/5) et interlaboratoire (80.0 %, 16/20), lesquelles pouvaient satisfaire aux critères d'acceptabilité fixés à 80 % (6). Afin de déterminer la valeur prédictive, on a collecté des informations immunotoxicologiques et sélectionné des données de références en classant chaque produit chimique dans la catégorie « composé immunotoxique visant les lymphocytes T » ou dans la catégorie « autre » selon des critères préalablement renseignés. L'étude de validation a permis de calculer, par rapport aux données de référence, une sensibilité, une spécificité et une valeur prédictive moyennes de 75.0 % (36/48), 75.0 % (18/24) et 75.0 % (54/72), respectivement (7), tandis qu'un autre examen de la valeur prédictive conduit par le laboratoire principal sur 60 produits chimiques supplémentaires a donné une sensibilité, une spécificité et une valeur prédictive de 82.4 % (28/34), 83.3 % (5/6) et 82.5 % (33/40), respectivement. Ces résultats ont été vérifiés par un groupe international d'examen par les pairs. La valeur prédictive obtenue n'est pas satisfaisante si l'on prévoit d'appliquer seule la méthode ; cependant l'essai IL 2 Luc est recevable s'il est utilisé dans le cadre d'une approche intégrée en matière d'essai et d'évaluation (IATA) (8). L'essai IL 2 Luc constitue un outil de criblage rapide qui, associé à d'autres essais d'immunotoxicité, peut faire partie d'une évaluation systématique de l'immunotoxicité.

7. Actuellement, l'évaluation de l'immunotoxicité des produits chimiques repose principalement sur des modèles animaux et sur des essais qui caractérisent l'immunosuppression et la sensibilisation. Mais les études sur les animaux présentent de nombreux inconvénients : elles sont coûteuses, elles soulèvent des préoccupations éthiques et leur capacité à prédire les effets sur la santé humaine est variable (9). De plus, les modèles *in vivo* actuels ne permettent pas toujours une compréhension mécanistique des données. Pour lever ces difficultés, il faut mettre au point des méthodes *in vitro* en mesure de détecter l'immunotoxicité. Un atelier organisé en 2003 par le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives s'est penché sur les systèmes *in vitro* les plus récents qui permettent d'évaluer l'immunotoxicité (10)(11)(12) et une approche par étapes a été proposée. Dans le cadre de cette approche, l'essai Multi-ImmunoTox (MITA) évalue les effets de produits chimiques sur les promoteurs d'IL 2, d'IFN- $\gamma$ , d'IL 1 $\beta$  et d'IL 8 en utilisant trois lignées cellulaires rapporteurs stables (13)(14).

8. Le but de la présente Ligne directrice pour les essais (LD) est de décrire la procédure utilisée pour évaluer le potentiel immunotoxique de produits chimiques sur les lymphocytes T. L'essai IL 2 Luc, qui permet d'évaluer le potentiel immunotoxique de produits chimiques dans le cadre d'un ensemble d'essais (JaCVAM, 2020b), est une méthode importante en raison de sa simplicité technique, de sa rapidité et de la précision de ses résultats, fondés sur un mécanisme d'immunotoxicité connu. Il est applicable aux produits chimiques d'essai solubles ou à ceux qui forment une dispersion stable mais, pour ce qui est des produits hautement hydrophobes il partage les mêmes limites que beaucoup d'essais conduits sur des suspensions cellulaires. Les produits chimiques d'essai qui interfèrent avec la luciférase peuvent masquer l'activité de celle-ci ou en empêcher la mesure, ce qui peut donner l'apparence d'une inhibition ou une luminescence accrue (15). De plus, il convient de noter les limites suivantes : cet essai ne permet pas de détecter 1) l'immunotoxicité associée à l'inhibition de la synthèse de l'ADN et de la division cellulaire (7)(13) ; 2) les produits chimiques d'essai qui ne forment un métabolite immunotoxique qu'après activation métabolique (7)(13).

### **Limites spécifiques**

9. On tiendra compte des limites suivantes : 1) l'utilisation de la PMA/de l'I $\alpha$  comme activateurs contourne la voie de signalisation qui passe par le récepteur des lymphocytes T (TCR) ainsi que les étapes de signalisation intracellulaire postérieures qui précèdent l'activation de la phospholipase C, ce qui signifie qu'il n'est pas possible de détecter des produits chimiques qui agissent sur ces molécules de signalisation amont (16); 2) il a été démontré que la lignée Jurkat (dont proviennent les cellules 2H4) est adaptée à l'étude des mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'immunotoxicité (17), mais elle peut ne pas posséder plusieurs protéines clés qui participent à l'activation des lymphocytes T normaux en réponse à la stimulation du TCR et pourrait donc ne pas être en mesure de détecter les effets des produits chimiques qui interfèrent avec ces protéines clés.

10. Les définitions sont fournies à l'appendice I.

## **PRINCIPE DE L'ESSAI**

11. L'essai IL 2 Luc utilise une lignée humaine Jurkat de leucémie aigüe lymphoblastique T fournie par le professeur Kazuo Sugamura, du département de Microbiologie de la faculté de Médecine à l'université de Tohoku. À partir de cette lignée, l'institut de biotechnologie de Tsuruga, TOYOBO Co., Ltd a établi une lignée cellulaire rapporteur IL 2 dérivée des cellules Jurkat, la lignée 2H4, qui possède les gènes des luciférases SLG, SLO et SLR placés respectivement sous le contrôle des promoteurs IL 2, IFN-

$\gamma$  et GAPDH (5). Les laboratoires désireux de réaliser l'essai peuvent obtenir la lignée cellulaire 2H4 recombinante auprès de la Tottori Bioscience Promotion Organization, Tottori (Japon), après signature d'un accord de transfert de matériel. Cette lignée cellulaire permet de quantifier l'induction du gène de la luciférase en détectant la luminescence issue d'un substrat de luciférase connu pour son émission lumineuse, comme indicateur de l'activité d'IL 2, d'IFN- $\gamma$  et de la GAPDH dans les cellules à la suite de l'exposition à des produits chimiques immunotoxiques. Pour simplifier l'essai, et sur la base d'observations décrites dans la littérature scientifique, seules l'activité de la luciférase placée sous le contrôle du promoteur IL 2 (IL2LA) et l'activité de la luciférase placée sous le contrôle du promoteur GAPDH ont été utilisées (14). La plupart des produits chimiques examinés à l'aide des cellules 2H4 ont montré des effets inhibiteurs proches pour IL2LA et pour l'activité de la luciférase placée sous le contrôle du promoteur IFN (IFNLA). De plus, lorsqu'on trace les courbes des concentrations minimales avec effet observé (CMEO) de ces produits chimiques en fonction de leurs effets sur IL2LA et sur IFNLA, on observe une corrélation significative entre elles. Il a donc été décidé d'utiliser uniquement IL2LA.

12. Le système d'essai multicolore (18) (19) comprend une luciférase émettant dans le vert (SLG ;  $\lambda_{\max} = 550$  nm) (Ohmiya et al., 2000) pour l'expression génique du promoteur IL 2, une luciférase émettant dans l'orange (SLO ;  $\lambda_{\max} = 580$  nm) (21) pour l'expression génique du promoteur IFN- $\gamma$ , ainsi qu'une luciférase émettant dans le rouge (SLR ;  $\lambda_{\max} = 630$  nm) (22) pour l'expression génique du promoteur GAPDH, le témoin interne. Les trois luciférases émettent dans des couleurs différentes lorsqu'elles réagissent à la d-luciférine de luciole et leur luminescence est mesurée en parallèle, lors d'une réaction en une étape, en subdivisant la lumière émise dans le mélange d'essai à l'aide de deux filtres optiques (18) (voir appendice II). Afin de garantir la précision des mesures de luminescence, il convient d'utiliser un luminomètre haute sensibilité (par exemple, un luminomètre dédié à la mesure de la luminescence tel que décrit à l'appendice II).

13. Les cellules 2H4 sont traitées pendant une heure (1 h) avec le produit chimique d'essai, puis exposées pendant 6 h à la PMA et à l'I $\alpha$ , après quoi on mesure l'activité de la luciférase SLG (SLG-LA), marqueur de l'activité du promoteur IL 2, l'activité de la luciférase SLO (SLO-LA), marqueur de l'activité du promoteur IFN- $\gamma$ , et l'activité de la luciférase SLR (SLR-LA), marqueur de l'activité du promoteur GAPDH. Par souci de lisibilité, SLG-LA, SLO-LA et SLR-LA sont respectivement appelées IL2LA, IFNLA et GAPLA. On trouvera au tableau 1 une description des termes associés à l'activité de la luciférase dans l'essai IL 2 Luc. Les valeurs mesurées sont utilisées pour calculer les valeurs IL2LA et IFNLA normalisées (nIL2LA et nIFNLA, respectivement), c'est-à-dire le rapport entre IL2LA ou IFNLA et GAPLA, respectivement ; ces valeurs sont également utilisées pour calculer l'inhibition de GAPLA (Inh-GAPLA), soit le rapport entre la moyenne arithmétique des quatre valeurs de GAPLA mesurées dans les cellules 2H4 exposées à un produit chimique d'essai et les valeurs de GAPLA de cellules 2H4 non exposées, cette valeur d'inhibition servant d'indicateur de cytotoxicité. Le pourcentage d'inhibition (% inhibition), calculé comme indiqué dans le tableau, indique l'effet des produits chimiques d'essai sur les promoteurs IL 2 et IFN- $\gamma$ .

Tableau 1. Description des termes associés à l'activité de la luciférase dans l'essai IL 2 Luc

Abréviations	Définition
IL2LA	Activité de la luciférase verte SLG indicative de l'activité du promoteur IL 2
IFNLA	Activité de la luciférase orange SLO indicative de l'activité du promoteur IFN- $\gamma$
GAPLA	Activité de la luciférase rouge SLR indicative de l'activité du promoteur GAPDH
nIL2LA	IL2LA / GAPLA
nIFNLA	IFNLA / GAPLA
Inh-GAPLA	GAPLA des cellules 2H4 exposées aux produits chimiques / GAPLA des cellules non exposées
% inhibition	$(1 - (\text{nIL2LA des cellules 2H4 exposées aux produits chimiques}) / (\text{nIL2LA des cellules non exposées})) \times 100$
CV05	La plus faible concentration du produit chimique d'essai à laquelle Inh-GAPLA devient $< 0.05$ .

14. L'essai IL-2 Luc permet d'observer simultanément GAPLA et IL2LA. L'ARNm de la GAPDH est exprimé partout à des niveaux modérés. Il est fréquemment utilisé comme témoin endogène lors de réactions en chaîne par polymérase en temps réel (PCR quantitative) dans divers schémas expérimentaux, car son expression est constante au fil du temps et après les manipulations expérimentales (23)(24)(25). De plus, le laboratoire principal a démontré que la détection des cellules mourantes par Inh-GAPLA est plus sensible que celle utilisant le pourcentage de cellules excluant l'iodure de propidium (IP), et que plus de 75 % des cellules excluant l'IP sont présentes parmi les cellules pour lesquelles Inh-GAPLA  $\geq 0.05$ . (26). Par conséquent, les résultats ont été évalués en utilisant uniquement des données obtenues à des concentrations auxquelles Inh-GAPLA  $\geq 0.05$ .

## DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES

15. Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai décrite dans la présente Ligne directrice, les laboratoires doivent faire la preuve de leurs compétences techniques en appliquant la méthode aux neuf substances d'épreuve listées à l'appendice III et conformément aux Bonnes pratiques applicables aux méthodes in vitro (27). En outre, les utilisateurs de la méthode devront conserver une base de données historiques générées avec les vérifications de réactivité, avec le témoin positif et avec les témoins solvant/véhicule, et devront utiliser ces données pour confirmer la reproductibilité au cours du temps de la méthode d'essai au sein de leur laboratoire.

## MODE OPÉRATOIRE

16. Un mode opératoire normalisé (SOP) est disponible pour l'essai IL 2 Luc et doit être suivi lors de la mise en œuvre de la méthode d'essai (28). Les paragraphes qui suivent fournissent une description des principaux composants et protocoles de l'essai.

**Préparation des cellules**

17. À leur réception, les cellules 2H4 sont repiquées (2-4 repiquages) et congelées pour être stockées en réserve homogène. Les cellules de cette réserve peuvent être repiquées jusqu'à six semaines, sans dépasser 12 repiquages. Le milieu de culture utilisé pour le repiquage est le RPMI-1640 contenant 10 % de sérum bovin fœtal (SBF), une solution d'antibiotique/ antimycosique (100 U/mL de pénicilline G, 100 µg/mL de streptomycine et 0.25 µg/mL d'amphotéricine B dans une solution saline à 0.85 %) (GIBCO Cat#15240-062, par exemple), 0.15 µg/mL de puromycine (CAS:58-58-2, par exemple), 300 µg/mL de G418 (CAS:108321-42-2, par exemple) et 200 µg/mL d'hygromycine B (CAS:31282-04-9, par exemple).

18. Les cellules, avant d'être utilisées pour l'essai, doivent être qualifiées par une vérification de réactivité. Cette vérification doit être réalisée 1 à 2 semaines ou 2 à 4 passages après décongélation, en utilisant les témoins positifs dexaméthasone (100 µg/mL) (CAS:50-02-2, pureté ≥ 98 %) et ciclosporine A (100 ng/mL) (CAS:59865-13-3, pureté ≥ 95 %). La dexaméthasone et la ciclosporine A doivent provoquer une réponse positive en termes de pourcentage d'inhibition (% inhibition ≥ 35). Seules les cellules ayant réussi la vérification de réactivité sont utilisées pour l'essai. La vérification est réalisée suivant la procédure décrite au paragraphe 26.

19. En vue de l'essai, les cellules 2H4 sontensemencées à une densité comprise entre 1 et  $3 \times 10^5$  cellules/mL, puis placées en préculture dans des flacons de culture pendant 72 à 96 h. Le jour de l'essai, les cellules sont récoltées dans le flacon de culture et rincées avec du RPMI-1640 contenant 10 % de SBF sans antibiotiques, puis remises en suspension à une densité de  $4 \times 10^6$  cellules/mL dans du RPMI-1640 contenant 10 % de SBF sans antibiotiques. Les cellules sont ensuite réparties dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (Corning Costar Cat#3603, par exemple) à raison de 50 µL par puits ( $2 \times 10^5$  cellules/puits).

**Préparation des produits chimiques d'essai et des substances témoin**

20. Les produits chimiques d'essai et les substances témoin sont préparés le jour de l'essai. Pour l'essai IL 2 Luc, le produit chimique d'essai est dissous dans de l'eau distillée ou dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) (solution mère). Le produit chimique d'essai est d'abord dissous dans de l'eau distillée.

- Si le produit chimique est soluble à 25 mg/mL, ajouter jusqu'à 1 mL d'eau distillée à 0.050 g de produit chimique d'essai dans une fiole jaugée. Si le produit chimique d'essai n'est pas soluble à 50 mg/mL, la concentration maximale de solubilité est 25 mg/mL. Si le produit chimique est soluble à 50 mg/mL, ajouter jusqu'à 1 mL d'eau distillée à 0.100 g de produit chimique d'essai dans une fiole jaugée. Si le produit chimique d'essai n'est pas soluble à 100 mg/mL, la concentration maximale de solubilité est 50 mg/mL.
1. Si le produit chimique d'essai n'est pas soluble à 25 mg/mL dans l'eau distillée, il est dissous dans le DMSO à une concentration de 500 mg/mL. Si le produit chimique d'essai n'est pas soluble à 500 mg/mL, la concentration la plus élevée considérée est la concentration maximale de solubilité après dilution d'un facteur 2 dans le DMSO (voir schéma à l'appendice IV). La sonication et l'agitation au vortex sont possibles, si nécessaire. Centrifuger à 15 000 rpm ( $\approx 20\,000 \times g$ ) pendant 5 min et confirmer la solubilité par l'absence de précipité. Le produit chimique d'essai doit être utilisé dans les 4 h qui suivent sa dissolution dans l'eau distillée ou dans le DMSO.

21. La première épreuve a pour but de déterminer la concentration cytotoxique et d'évaluer le potentiel immunotoxique des produits chimiques. À partir des solutions mères de produits chimiques d'essai dissous dans l'eau distillée ou dans le DMSO, on réalise des dilutions en série de facteur 2 (voir appendice IV) au moyen d'une plaque microtitre transparente 96 puits à fond rond. Si le produit chimique est préparé dans l'eau distillée, diluer 20 µL de la solution mère précédemment diluée dans 480 µL de milieu dans un bloc de stockage 96 puits (p. ex., Corning Costar Cat#3960) puis ajouter 50 µL de la solution diluée obtenue à 50 µL de suspension cellulaire dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat. Si le produit chimique est préparé dans le DMSO, diluer 10 µL de la solution mère précédemment diluée dans 90 µL de milieu dans une plaque microtitre transparente 96 puits à fond rond, puis diluer 10 µL de la solution diluée obtenue dans 490 µL de milieu dans un bloc de stockage 96 puits, et enfin ajouter 50 µL de la solution diluée à 50 µL de suspension cellulaire dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat.

22. Par conséquent, lorsque les produits chimiques sont préparés à une concentration de 100 mg/mL dans l'eau distillée, leurs concentrations finales d'essai sont comprises entre 0.004 et 2 mg/mL ; lorsque les produits chimiques sont préparés à une concentration de 500 mg/mL dans le DMSO, leurs concentrations finales d'essai sont comprises entre 0.001 et 0.5 mg/mL (appendice IV).

23. Dans les épreuves suivantes (épreuves deux, trois et quatre), la solution mère dans l'eau distillée ou la solution mère dans le DMSO sont préparées à une concentration respectivement 100 fois ou 2 000 fois supérieures à la concentration de viabilité cellulaire 05 (CV05, la concentration la plus faible à laquelle Inh-GAPLA devient < 0.05) observée lors de la première épreuve. Si, lors de la première épreuve, aucune concentration ne fait passer la valeur Inh-GAPLA sous le seuil de 0.05, la concentration de la solution mère dans les épreuves suivantes est la même que la concentration utilisée lors de cette première épreuve.

24. Chaque concentration du produit chimique d'essai est testée dans 4 puits. Les échantillons sont ensuite mélangés sur un agitateur de plaques et placés en incubation pendant 6 h à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

25. Au bout d'1 h d'incubation avec le produit chimique d'essai, les cellules sont stimulées avec 25 nM de PMA et 1 µM d'Io pendant 6 h. Par exemple, on prépare une solution 10x de PMA/ionomycine en diluant dans le milieu une solution de PMA dans le DMSO à 2 mM et une solution d'ionomycine dans l'éthanol à 2 mM, puis on ajoute 10 µL de la solution 10x de PMA/ionomycine à 90 µL de suspension cellulaire contenant le produit chimique d'essai. Ensuite, l'activité de la luciférase est mesurée comme indiqué au paragraphe 30.

26. Les témoins positifs recommandés sont la dexaméthasone et la ciclosporine A. Par exemple, ajouter 10 µL de solution de dexaméthasone dans le DMSO (à 100 mg/mL) ou 10 µL de solution de ciclosporine A dans le DMSO (à 100 µg/mL) à 90 µL de milieu dans une plaque microtitre transparente 96 puits à fond rond, diluer 10 µL de la solution ainsi diluée dans 490 µL de milieu dans un bloc de stockage 96 puits, enfin ajouter 50 µL de la solution ainsi diluée à 50 µL de suspension cellulaire dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat. Les concentrations finales de dexaméthasone et de ciclosporine A sont de 100 µg/mL et de 100 ng/mL, respectivement. Chaque concentration du témoin positif est testée dans 4 puits. Les échantillons sont ensuite mélangés sur un agitateur de plaques et placés en incubation pendant 1 h à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont stimulées avec 25 nM de PMA et 1 µM d'Io pendant 6 h, après quoi l'activité de la luciférase est mesurée comme décrit aux paragraphes 30 à 33.

27. Le solvant et témoin négatif est le RPMI-1640 supplémenté avec 10 % de SBF contenant 2 % d'eau distillée ou 1 % de DMSO. D'autres témoins positifs ou négatifs adaptés peuvent être utilisés s'il existe des données historiques dont on peut tirer des critères d'acceptabilité comparables pour les épreuves.



28. Il convient de prendre des précautions pour éviter l'évaporation des produits chimiques d'essai volatiles ainsi que toute contamination croisée entre puits par les produits chimiques d'essai (en scellant la plaque avant incubation avec les produits chimiques d'essai, par exemple).

29. Il est nécessaire de soumettre les produits chimiques d'essai et le témoin solvant à 2 à 4 épreuves afin d'obtenir des données qu'on peut évaluer et dont on peut tirer un modèle de prédiction (voir paragraphes 35 et 36). Chaque épreuve est effectuée un jour différent avec une solution-mère fraîche de produit chimique d'essai et des cellules récoltées de façon indépendante. Les cellules peuvent être issues du même repiquage.

### **Mesure de l'activité de la luciférase**

30. La luminescence est mesurée à l'aide d'un luminomètre pour microplaques 96 puits équipé de filtres optiques, par exemple Phelios (ATTO, Tokyo, Japon), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Allemagne) ou ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, États-Unis). Les filtres optiques peuvent être des filtres coupe-bande (filtres passe-haut ou passe-bas) ou des filtres passe-bande. Le luminomètre peut être qualifié pour garantir la reproductibilité au moyen d'une source lumineuse de référence à diode photoémettrice (LED) (29).

31. Avant l'essai, il convient d'utiliser les luciférases émettant dans le vert, l'orange et le rouge pour déterminer les coefficients de transmission des filtres qui permettront de distinguer chaque signal bioluminescent (30), comme décrit à l'appendice II.

32. On transfère 100 µL de réactif pré-chauffé Tripluc® Luciférase (Tripluc) dans chaque puits de la plaque microtitre qui contient la suspension cellulaire traitée avec ou sans produit chimique d'essai et avec ou sans PMA/Io. On agite la plaque pendant 10 min à température ambiante (environ 20 °C) puis on la place dans le luminomètre pour mesurer l'activité de la luciférase. La bioluminescence est mesurée pendant 3 sec en l'absence de filtre optique (F0) et 3 sec avec les filtres optiques (F1, F2). Il convient de justifier le recours à d'autres réglages, selon le modèle de luminomètre utilisé, par exemple.

33. On calcule les paramètres associés à chaque concentration à partir des mesures obtenues, par exemple IL2LA, GAPLA, nIL2LA, Inh-GAPLA, la moyenne ± écart type (ET) d'IL2LA, la moyenne ±ET de GAPLA, la moyenne ±ET de nIL2LA, la moyenne ±ET d'Inh-GAPLA et le % d'inhibition, en utilisant la feuille de calcul Excel disponible avec l'essai IL 2 Luc (voir <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4software.htm>). Les définitions et les calculs des paramètres utilisés dans le présent paragraphe, c.à.d. l'activité de la luciférase et l'index de suppression, sont fournies aux appendices II et V, respectivement.

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Évaluation des données**

34. Dans chaque épreuve, un produit chimique est considéré comme positif (immunosuppresseur ou immunostimulant) lorsque les trois critères suivants sont vérifiés :

1. La moyenne du % d'inhibition est  $\geq 35$  (suppresseur) ou  $\leq -35$  (stimulant) et statistiquement significative. La significativité statistique est déterminée avec l'intervalle de confiance de 95 %.

2. L'essai donne lieu à au moins deux résultats consécutifs statistiquement significatifs (hausse ou baisse), ou un résultat statistiquement significatif (hausse ou baisse) avec une même tendance pour au moins trois points de mesure consécutifs (c'est-à-dire que l'on observe une tendance dose-dépendante). Dans ce dernier cas, la tendance peut croiser la valeur 0, tant qu'il n'y a pas plus d'un point de mesure qui ne suit pas la tendance observée et qui ne devient statistiquement significatif pour l'effet opposé. Des graphiques illustrant le critère 2 sont disponibles à l'Appendice V.
3. Les résultats sont évalués en utilisant uniquement des données obtenues à des concentrations auxquelles  $\text{Inh-GAPLA} \geq 0.05$ .

Dans tous les autres cas, le produit chimique d'essai est considéré comme sans effet (négatif).

### **Modèle de prédiction**

35. On répète les épreuves jusqu'à obtention de deux épreuves positives (ou négatives) concordantes. On réalise au maximum trois épreuves. Le caractère immunotoxique est évalué en utilisant la moyenne du % d'inhibition et l'intervalle de confiance de 95 % de celle-ci.

36. Comme expliqué au paragraphe 4, IL 2 exerce une action pléiotropique sur la différenciation des lymphocytes T CD4+ grâce à sa capacité de modulation de l'expression des récepteurs de cytokines. En effet, IL 2 promeut la différenciation des lymphocytes Th1 et Th2 et favorise la différenciation des lymphocytes T régulateurs. Ceci suggère donc que l'augmentation de la transcription du gène IL 2 peut provoquer soit une stimulation soit une suppression de l'activité immunitaire selon l'environnement tissulaire *in vivo*. Pour cette raison, dans cet essai, un produit chimique d'essai qui exerce une action stimulante ou inhibitrice est considéré comme positif.

### **Critères d'acceptabilité**

37. Le critère d'acceptabilité suivant s'applique à l'essai :

Si le facteur multiplicatif de l'induction de nIFN $\alpha$  des puits contenant de la PMA/Io mais pas de produit chimique (= (nIFN $\alpha$  des cellules 2H4 exposées à la PMA/Io) / (nIFN $\alpha$  des cellules 2H4 non exposées)) est inférieur à 3.0, alors les résultats obtenus dans la plaque contenant les puits témoins doivent être rejetés.

## **RAPPORT D'ESSAI**

38. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes :

Produit chimique d'essai

- Substance monoconstituant :
  - Identification chimique telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants ;
  - Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physicochimiques pertinentes, 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) ;
  - Concentration(s) testée(s) ;
  - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
  - Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai si l'eau distillée ou le DMSO n'ont pas été utilisés.
- Substance multiconstituant, UVCB ou mélange :
- Caractérisation, dans la mesure du possible, par exemple par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, la présence, la quantité et les propriétés physicochimiques pertinentes (voir ci-dessus) des constituants, selon les données disponibles ;
  - Apparence physique, hydrosolubilité et autres propriétés physicochimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
  - Masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude ;
  - Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
  - Concentration(s) testée(s) ;
  - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
  - Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai si l'eau distillée ou le DMSO n'ont pas été utilisés.

#### Témoins

- Témoin positif :
- Identification chimique telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants ;
  - Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physicochimiques pertinentes, selon les données disponibles et s'il y a lieu ;
  - 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) ;
  - Justification du choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai si l'eau distillée ou le DMSO n'ont pas été utilisés ;
  - Concentration(s) testée(s) ;
  - Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
  - Référence aux données historiques relatives aux témoins positifs démontrant la conformité aux critères d'acceptabilité, s'il y a lieu.
- Témoin négatif :
- Identification chimique telle que désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants ;

- Pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
- Apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physicochimiques pertinentes, si des témoins négatifs autres que ceux mentionnés dans la Ligne directrice sont utilisés, et selon les données disponibles ;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- Justification du choix du solvant pour chaque produit chimique d'essai.

#### Conditions 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, conditions de stockage et origine (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple) ;
- Numéro de lot et origine du SBF, nom du fournisseur, numéro de lot de la plaque microtitre noire 96 puits à fond plat, numéro de lot du réactif Tripluc ;
- Nombre de repiquages et densité cellulaire au moment de l'essai ;
- Méthode de numération cellulaire utilisée pour l'ensemencement avant l'essai et mesures mises en œuvre pour garantir une répartition homogène des cellules ;
- Luminomètre utilisé (modèle, par exemple), y compris réglages de l'instrument, substrat de luciférase utilisé, et démonstration de l'adéquation des mesures sur la base des principes décrits à l'Appendice II ;
- Procédure appliquée par le laboratoire pour faire la preuve de sa compétence à mettre en œuvre la méthode d'essai (en testant les substances d'épreuve, par exemple) ou pour démontrer la reproductibilité de l'application de la méthode d'essai au fil du temps.

#### Mode opératoire

- Nombre d'épreuves réalisées ;
- Concentrations des produits chimiques d'essai, procédure d'application et durée d'exposition (si celles-ci diffèrent des recommandations) ;
- Description des critères d'évaluation et de décision appliqués ;
- Description des critères d'acceptabilité de l'étude appliqués ;
- Description de toutes modifications apportées au mode opératoire.

#### Résultats

- Mesures de IL2LA, IFNLA et GAPLA ;
- Calculs de nIL2LA, nIFNLA, Inh-GAPLA et % inhibition ;
- Intervalle de confiance de 95 % de % inhibition ;
- Graphique présentant les courbes dose-effet pour l'induction de l'activité de la luciférase et la viabilité ;
- Description de toute autre observation pertinente, s'il y a lieu ;
- Discussion des résultats
- Discussion des résultats obtenus avec l'essai IL 2 Luc ;
- Examen des résultats de l'essai dans le contexte d'une démarche intégrée (IATA), si d'autres

informations pertinentes sont disponibles.

Toute modification par rapport à la Ligne directrice pour les essais.

Conclusion

## BIBLIOGRAPHIE

1. Corsini, E., Roggen, E.L., 2009. Immunotoxicology: opportunities for non-animal test development. *Altern. Lab. Anim.* 37(4), 387-97.
2. OECD (2022) Detailed Review Paper: *In vitro* tests addressing immunotoxicity with a focus on immunosuppression, OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.???. OECD, Paris, France.
3. OECD (2021) OECD Series on Adverse Outcome Pathways No. 18 , [Adverse Outcome Pathway on inhibition of calcineurin activity leading to impaired T-cell dependent antibody response](#), OECD, Paris, France.
4. Liao, W., Lin, J.X., Wang, L., Peng, L., Leonard, W.J. (2011), Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat. Immunol.* 12, 551-559.
5. Saito, R., Hirakawa, S., Ohara, H., Yasuda, M., Yamazaki, T., Nishii, S., Aiba, S., 2011. Nickel differentially regulates NFAT and NF-kappaB activation in T cell signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 254(3), 245-255.
6. [JaCVAM](#), Report on a Validation Study of the IL-2 Luc Assay for Evaluating the Potential Immunotoxic Effects of Chemicals on T-Cells, [https://www.jacvam.jp/list.html\(2020a\)](https://www.jacvam.jp/list.html(2020a))
7. Kimura, Y., Yasuno, R., Watanabe, M., Kobayashi, M., Iwaki, T., Fujimura, C., Ohmiya, Y., Yamakage, K., Nakajima, Y., Kobayashi, M., Mashimo, N., Takagi, Y., Omori, T., Corsini, E., Germolec, D., Inoue, T., Roggen, E.L., Kojima, H., Aiba, S., 2020. An international validation study of the IL-2 Luc assay for evaluating the potential immunotoxic effects of chemicals on T cells and a proposal for reference data for immunotoxic chemicals. *Toxicol. in Vitro* 66. doi: 10.1016/j.tiv.2020.104832.
8. JaCVAM, IL-2 Luc assay peer review report, [https://www.jacvam.jp/list.html\(2020b\)](https://www.jacvam.jp/list.html(2020b))
9. Adler, S., Basketter, D., Creton, S., et al., 2011. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch Toxicol* 85, 367-485.
10. Gennari, A., Ban, M., Braun, A., Casati, S., Corsini, E., Dastych, J., Descotes, J., Hartung, T., Hooghe-Peters, R., House, R., Pallardy, M., Pieters, R., Reid, L., Tryphonas, H., Tschirhart, E., Tuschl, H., Vandebriel, R., Gribaldo, L., 2005. The Use of *In Vitro* Systems for Evaluating Immunotoxicity: The Report and Recommendations of an ECVAM Workshop. *J. Immunotoxicol.* 2(2), 61-83.
11. Galbiati, V., Mitjans, M. & Corsini, E., 2010. Present and future of *in vitro* immunotoxicology in drug development. *J. Immunotoxicol.* 7(4), 255-267.
12. Lankveld, D.P., Van Loveren, H., Baken, K.A., Vandebriel, R.J., 2010. *In vitro* testing for direct immunotoxicity: state of the art. *Methods Mol. Biol.* 598, 401-423.
13. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Aiba, S., 2014. Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. *Toxicol. in Vitro* 28(5), 759-768.
14. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Terui, H., Aiba, S., 2018. Profiling the immunotoxicity of chemicals based on *in vitro* evaluation by a combination of the Multi-ImmunoTox assay and the IL-8 Luc assay. *Arch. Toxicol.* 92(6), 2043-2054.

15. Thorne, N., Inglese, J., Auld, D.S. (2010), Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* 17: 646-657, 10.1016/j.chembiol.2010.05.012
16. Ohtsuka, T., Jiziro, Y., Satoh, T., (1996), Analysis of the T-cell activation signaling pathway mediated by tyrosine kinase, protein kinase C, and Ras protein, which is mediated by intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Acta*. 1310: 2223-232. 10.1016/0167-4889(95)00172-7
17. Shao, J., Katika, MR., Schmeits, PCJ., Mendriksen, PJM., van Lovere, H., Peijnenburg, ACM., Volger, OL., (2013), Toxicogenomics-based identification of mechanisms for direct immunotoxicity. *Toxicol Sci* 135: 328-346. 10.1093/toxsci/kft151
18. Nakajima, Y., Kimura, T., Sugata, K., et al. (2005), Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. *Biotechniques* 38: 891-894, 10.2144/05386ST03.
19. Nakajima, Y., Ohmiya, Y., (2010), Bioluminescence assays: multicolor luciferase assay, secreted luciferase assay and imaging luciferase assay. *Exp. Opin. Drug Discov.* 5: 835-849, 10.1517/17460441.2010.506213.
20. Ohmiya, Y., Sumiya, M., Viviani, V.R., Ohba, N. (2000), Comparative aspects of a luciferase molecule from Japanese luminous beetle, *Rhagophthalmus ohbai*. *Sci. Rept. Yokosuka City Mus.* 47:31-38.
21. Viviani, V., Uchida, A., Suenaga, N., et al. (2001), Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1286-1291, 10.1006/bbrc.2001.4254
22. Viviani, V.R., Bechara, E.J., Ohmiya, Y. (1999), Cloning, sequence analysis, and expression of active *Phrixothrix* railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. *Biochemistry* 38: 8271-8279, 10.1021/bi9900830
23. Edwards, D.R., Denhardt, D.T. (1985), A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. *Exp Cell Res* 157: 127-143.
24. Mori, R., Wang, Q., Danenberg, K.D., et al. (2008), Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* 68: 1555-1560, 10.1002/pros.20815
25. Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., et al. (1999), Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 270: 41-49, 10.1006/abio.1999.4085
26. Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Nakajim, Y., Ohmiya, Y., Aiba, S., 2015. Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. *Toxicol in Vitro*. 29, 1816-1830.
27. OECD (2017), Guidance document: Good In Vitro Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of In Vitro Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No.286. JaCVAM, IL-2 Luc assay protocol, <https://www.jacvam.jp/list.html> (2020c)
28. JaCVAM (2020c) : Standard Operating Procedures

29. Yasunaga, M., et al. (2017), Continuous long-term cytotoxicity monitoring in 3D spheroids of beetle luciferase-expressing hepatocytes by nondestructive bioluminescence measurement. *BMC Biotechnol.* 17: 54, 10.1186/s12896-017-0374-1
30. Niwa, K., Ichino, Y., Kumata, S., Nakajima, Y., Hiraishi, Y., Kato, D., Viviani, V.R., Ohmiya, Y. (2010) Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. *Photochem. Photobiol.* 86:1046-9.



## APPENDICE I - DÉFINITIONS

**2H4** : lignée cellulaire rapporteur IL 2 utilisée dans l'essai IL 2 Luc. La lignée Jurkat de cellules humaines de leucémie aiguë lymphoblastique de type T a été transfectée avec les gènes de la luciférase SLG, SLO et SLR sous le contrôle des promoteurs IL 2, IFN- $\gamma$  et GAPDH, respectivement.

**Précision** : étroitesse de l'accord 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 au sens de « concordance », pour désigner la proportion de résultats corrects d'une méthode d'essai.

**AOP (*Adverse Outcome Pathway, voie toxicologique impliquée dans les effets indésirables*)** : séquence d'événements conduisant à la survenue d'un effet indésirable *in vivo*, à partir de la structure chimique d'un produit chimique cible ou d'un groupe de produits chimiques analogues et de l'événement initiateur au niveau moléculaire.

**CV05** : viabilité cellulaire 05. Concentration minimum à laquelle les produits chimiques génèrent une valeur Inh-GAPLA inférieure à 0.05.

**GAPLA** : activité de la luciférase rouge stable (*Stable Luciferase Red, SLR*) ( $\lambda_{\max} = 630$  nm), sous régulation du promoteur de GAPDH, qui démontre la viabilité cellulaire et donne le nombre de cellules viables.

**Danger** : propriété inhérente d'un agent ou d'une situation susceptible de provoquer des effets indésirables lorsqu'un organisme, un système ou une (sous-) population est exposé(e) à cet agent.

**IATA (*Integrated Approach to Testing and Assessment, approche intégrée en matière d'essai et d'évaluation*)** : approche structurée utilisée pour l'identification du danger (potentiel), la caractérisation du danger (puissance) et/ou l'évaluation de la sécurité (potentiel de danger/puissance du danger et exposition) d'un produit chimique ou d'un groupe de produits chimiques, qui intègre de façon stratégique et pondérée toutes les données pertinentes dans le but d'étayer une décision réglementaire concernant le danger potentiel et/ou le risque et/ou la nécessité d'effectuer des tests complémentaires ciblés (donc aussi limités que possible).

**IFNLA** : activité de la luciférase orange stable (*Stable Luciferase Orange, SLO*) ( $\lambda_{\max} = 580$  nm), sous régulation du promoteur de l'interféron (IFN)- $\gamma$ .

**II-SLR-LA** : abréviation employée dans le rapport de validation et dans des études précédentes,

faisant référence à Inh-GAPLA. Voir définition de Inh-GAPLA.

**IL 2 (Interleukine 2)** : cytokine dérivée des lymphocytes T qui provoque l'activation des lymphocytes T et B, des monocytes et des lymphocytes NK (cellules tueuses naturelles).

**IL2LA** : activité de la luciférase verte stable (*Stable Luciferase Green*, SLG) ( $\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$ ), sous régulation du promoteur IL 2.

**Inh-GAPLA** : inhibition de GAPLA. Calculée en divisant la valeur GAPLA des cellules 2H4 traitées avec les produits chimiques par la valeur GAPLA des cellules 2H4 non traitées, elle représente la cytotoxicité des produits chimiques.

**Seuil minimum d'induction (MIT)** : concentration la plus faible à laquelle un produit chimique remplit le critère de positivité.

**Mélange** : mélange ou solution constitué(e) d'au moins deux substances qui ne réagissent pas entre elles.

**Substance monoconstituant** : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle un constituant principal est présent à hauteur de 80 % minimum (m/m).

**Substance multiconstituant** : substance, définie par sa composition quantitative, dans laquelle plus d'un constituant principal est présent à une concentration  $\geq 10 \%$  (m/m) et  $< 80 \%$  (m/m). Une substance multiconstituant résulte d'un processus de fabrication. La différence entre un mélange et une substance multiconstituant est qu'un mélange est obtenu en associant deux substances ou plus sans qu'il se produise de réaction chimique. Une substance multiconstituant est le résultat d'une réaction chimique.

**nIL2LA** : activité de SLG qui reflète l'activité du promoteur IL 2 (IL2LA) normalisée par l'activité de SLR qui reflète l'activité du promoteur GAPDH (GALPA). Elle représente l'activité du promoteur IL 2 rapportée à la viabilité cellulaire ou au nombre de cellules.

**nSLG-LA** : abréviation employée dans de précédentes études sur l'essai IL 2 Luc, faisant référence à nIL2LA. Voir définition de nIL2LA.

**nSLO-LA** : abréviation employée dans de précédentes études sur l'essai IL 2 Luc, faisant référence à nIFNLA. Voir définition de nIFNLA.

**Témoin positif** : réplicat contenant tous les composants d'un système d'essai, traité avec une substance connue pour induire une réponse positive. Pour qu'il soit possible d'évaluer la variabilité dans le temps de la réponse du témoin positif, l'ampleur de la réponse positive ne doit pas être

excessive.

**Pertinence** : décrit la relation entre l'essai et l'effet étudié, et rend compte de l'adéquation de l'essai et de son utilité à des fins spécifiques. La pertinence indique dans quelle mesure l'essai mesure ou prédit correctement l'effet biologique d'intérêt. Elle tient compte de la précision (concordance) d'une méthode d'essai.

**Fiabilité** : indique dans quelle mesure la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au cours du temps par un même laboratoire ou plusieurs laboratoires utilisant le même mode opératoire. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoire et la répétabilité intralaboratoire.

**Sensibilité** : proportion des produits chimiques positifs/actifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation de la pertinence d'une méthode d'essai.

**SLG-LA** : abréviation employée dans de précédentes études sur l'essai IL 2 Luc, faisant référence à IL2LA. Voir définition de IL2LA.

**SLO-LA** : abréviation employée dans de précédentes études sur l'essai IL 2 Luc, faisant référence à IFNLA. Voir définition de IFNLA.

**SLR-LA** : abréviation employée dans de précédentes études sur l'essai IL 2 Luc, faisant référence à GAPLA. Voir définition de GAPLA.

**Témoin solvant/véhicule** : échantillon non traité contenant tous les composants d'un système d'essai, y compris le solvant/véhicule utilisé, mais à l'exception du produit chimique d'essai. Il sert à déterminer une réponse de référence pour les échantillons traités avec le produit chimique d'essai dissous ou en dispersion stable dans le même solvant/véhicule. Testé avec un témoin milieu concomitant, cet échantillon indique également si le solvant/véhicule interagit avec le système d'essai.

**Spécificité** : proportion des produits chimiques négatifs/inactifs qui sont correctement classés par l'essai. Elle permet de mesurer la précision d'une méthode d'essai produisant des données catégorielles, et constitue un aspect important de l'évaluation la pertinence d'une méthode d'essai.

**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.

**Produit chimique d'essai** : le terme « produit chimique d'essai » désigne ce qui est soumis à l'essai.

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

## APPENDICE II - PRINCIPES DE MESURE DE L'ACTIVITÉ DE LA LUCIFÉRASE ET DÉTERMINATION DES COEFFICIENTS DE TRANSMISSION DES FILTRES OPTIQUES POUR SLG, SLO ET SLR

Le système d'essai à plusieurs rapporteurs – Tripluc – peut être utilisé avec un luminomètre à microplaque doté d'un système de détection multi-couleurs équipé d'au moins deux types de filtre optique (Phelios AB-2350 [ATTO], ARVO [PerkinElmer] ou Tristar LB941 [Berthold], par exemple). On peut par exemple utiliser comme filtres optiques un filtre passe-haut 560 nm et un filtre passe-haut 600 nm.

(1) Mesure de trois couleurs de luciférase avec deux filtres optiques.

On se propose d'utiliser par exemple un appareil Phelios AB-2350 (ATTO). Ce luminomètre est équipé d'un filtre passe-haut 560 nm (filtre 1) et d'un filtre passe-haut 600 nm (filtre 2) destinés à la séparation optique.

Pour commencer, en utilisant les luciférases recombinantes SLG ( $\lambda_{\max} = 550$  nm), SLO ( $\lambda_{\max} = 580$  nm) et SLR ( $\lambda_{\max} = 630$  nm), mesurer i) l'intensité lumineuse sans filtre (tout optique), ii) l'intensité de la lumière transmise à travers le filtre 1 (560 nm), puis iii) l'intensité de la lumière transmise à travers le filtre 2 (600 nm), et calculer les coefficients de transmission énumérés ci-dessous.

Tableau. Définition des paramètres de l'essai avec luciférase

Coefficient de transmission		Abréviation	Définition
SLG	Facteur de transmission du filtre 1	$\kappa_{GR56}$	intensité de la lumière SLG transmise à travers le filtre 1 (560 nm) / intensité de la lumière SLG sans filtre (tout optique)

	Facteur de transmission du filtre 2	$\kappa_{GR60}$	intensité de la lumière SLG transmise à travers le filtre 2 (600 nm) / intensité de la lumière SLG sans filtre (tout optique)
SLO	Facteur de transmission du filtre 1	$\kappa_{OR56}$	intensité de la lumière SLO transmise à travers le filtre 1 (560 nm) / intensité de la lumière SLO sans filtre (tout optique)
	Facteur de transmission du filtre 2	$\kappa_{OR60}$	intensité de la lumière SLO transmise à travers le filtre 2 (600 nm) / intensité de la lumière SLO sans filtre (tout optique)
SLR	Facteur de transmission du filtre 1	$\kappa_{RR56}$	intensité de la lumière SLR transmise à travers le filtre 1 (560 nm) / l'intensité de la lumière SLR sans filtre (tout optique)
	Facteur de transmission du filtre 2	$\kappa_{RR60}$	intensité de la lumière SLR transmise à travers le filtre 2 (600 nm) / intensité de la lumière SLR sans filtre (tout optique)

En appelant respectivement G, O et R les intensités de SLG, SLO et SLR dans l'échantillon soumis à l'essai, on peut calculer i) l'intensité lumineuse sans filtre (tout optique) F0, ii) l'intensité lumineuse transmise à travers le filtre 1 (560 nm) F1 et iii) l'intensité lumineuse transmise à travers le filtre 2 (600 nm) F2 à l'aide des formules suivantes :

$$F0=G+O+R$$

$$F1=\kappa_{GR56} \times G + \kappa_{OR56} \times O + \kappa_{RR56} \times R$$

$$F2=\kappa_{GR60} \times G + \kappa_{OR60} \times O + \kappa_{RR60} \times R$$

On peut alors reformuler comme suit :

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \\ F2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ \kappa_{GR56} & \kappa_{OR56} & \kappa_{RR56} \\ \kappa_{GR60} & \kappa_{OR60} & \kappa_{RR60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix}$$

En utilisant les coefficients de transmission calculés et les valeurs F0, F1 et F2 mesurées, on peut alors en déduire les valeurs G, O et R grâce à la formule :

$$\begin{pmatrix} G \\ O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 \\ \kappa_{GR56} & \kappa_{OR56} & \kappa_{RR56} \\ \kappa_{GR60} & \kappa_{OR60} & \kappa_{RR60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \\ F2 \end{pmatrix}$$

*Matériel et méthode de détermination du facteur de transmission*

(1) Réactifs

· Enzymes de luciférase recombinante uniques purifiées :

Enzyme SLG purifiée lyophilisée

Enzyme SLO purifiée lyophilisée

Enzyme SLR purifiée lyophilisée

(lesquelles ont été obtenues, pour l'étude de validation, auprès de Tottori Bioscience Promotion Organization, Tottori, Japon, de même que la lignée cellulaire 2H4)

· Réactif :

Réactif Tripluc® Luciférase (obtenu par exemple auprès de TOYOBO Cat#MRA-301)

· Milieu : RPMI-1640 avec 10 % de SBF pour le test de luciférase (30 ml, stocké à 2 - 8 °C)

### (2) Préparation des solutions enzymatiques

Dissoudre les enzymes purifiées lyophilisées de luciférase dans un tube en ajoutant 200 µL de 10 ~ 100 mM Tris/HCl ou Hepes/HCl (pH 7.5 ~ 8.0) supplémenté avec 10 % (m/v) de glycérol, subdiviser la solution enzymatique en aliquotes de 10 µL dans des tubes jetables de 1.5 mL et stocker les tubes au congélateur à -80 °C. La solution congelée peut être utilisée pendant au maximum 6 mois. Pour utiliser les solutions, ajouter 1 ml du milieu de l'essai de luciférase (RPMI-1640 avec 10 % de SBF) à chaque tube de solution enzymatique (solution diluée) et maintenir les tubes sur la glace pour éviter toute désactivation.

### (3) Mesure de la bioluminescence

Décongeler le réactif de l'essai de luciférase Tripluc® (Tripluc) et le maintenir à température ambiante dans un bain marie ou sur la paillasse. Allumer le luminomètre 30 min avant le début des mesures, afin de permettre au photomultiplicateur de se stabiliser. Transférer 100 µL de la solution enzymatique diluée dans une plaque microtitre noire 96 puits à fond plat (échantillon de référence SLG en #B1, #B2, #B3, échantillon de référence SLO en #D1, #D2, #D3, échantillon de référence SLR en #F1, #F2, #F3). Transférer ensuite 100 µL de Tripluc préchauffé dans chaque puits de la plaque contenant la solution enzymatique diluée à l'aide d'une pipette. Agiter la plaque pendant 10 min à température ambiante (environ 25 °C) sur un agitateur de plaques. Éliminer les bulles qui pourraient se former dans les solutions. Placer la plaque dans le luminomètre pour mesurer l'activité de la luciférase. La bioluminescence est mesurée pendant 3 sec en l'absence de filtre optique (F0) et 3 sec avec les filtres optiques (F1, F2).

Les coefficients de transmission des filtres optiques sont calculés comme suit :

Coefficient de transmission (SLG ( $\kappa_{GR56}$ )) = (#B1 de F1+ #B2 de F1+ #B3 de F1) / (#B1 de F0+ #B2 de F0+ #B3 de F0)

Coefficient de transmission (SLO ( $\kappa_{OR56}$ )) = (#D1 de F1+ #D2 de F1+ #D3 de F1) / (#D1 de F0+ #D2 de F0+ #D3 de F0)

Coefficient de transmission (SLR ( $\kappa_{RR56}$ )) = (#F1 de F1+ #F2 de F1+ #F3 de F1) / (#F1 de F0+ #F2 de F0+ #F3 de F0)

Coefficient de transmission (SLG ( $\kappa_{GR60}$ )) = (#B1 de F2+ #B2 de F2+ #B3 de F2) / (#B1 de F0+ #B2 de F0+ #B3 de F0)

Coefficient de transmission (SLO ( $\kappa_{OR60}$ )) = (#D1 de F2+ #D2 de F2+ #D3 de F2) / (#D1 de F0+ #D2 de F0+ #D3 de F0)

Coefficient de transmission (SLR ( $\kappa_{RR60}$ )) = (#F1 de F2+ #F2 de F2+ #F3 de F2) / (#F1 de F0+ #F2 de F0+ #F3 de F0)

Les facteurs de transmission calculés sont utilisés pour toutes les mesures réalisées avec le même luminomètre.

*Contrôle de la qualité du matériel*

Il convient de suivre la procédure décrite dans le mode opératoire IL 2 Luc (JaCVAM, 2020c).



## APPENDICE III - SUBSTANCES D'ÉPREUVE DE COMPÉTENCE

Avant d'utiliser en routine la méthode d'essai décrite dans la présente Ligne directrice, les laboratoires doivent faire la preuve de leurs compétences technique en appliquant la méthode aux neuf substances d'épreuve listées dans cet appendice et conformément aux Bonnes pratiques applicables aux méthodes in vitro (1). En outre, les utilisateurs de la méthode devront conserver une base de données historiques générées avec les vérifications de réactivité (voir paragraphe 18), avec le témoin positif et avec le témoin solvant/véhicule (voir paragraphes 26-27), et devront utiliser ces données pour confirmer la reproductibilité au cours du temps de la méthode d'essai au sein de leur laboratoire.

1. OCDE (2017), *Projet de document-guide : Good In Vitro Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of In Vitro Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment*. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.

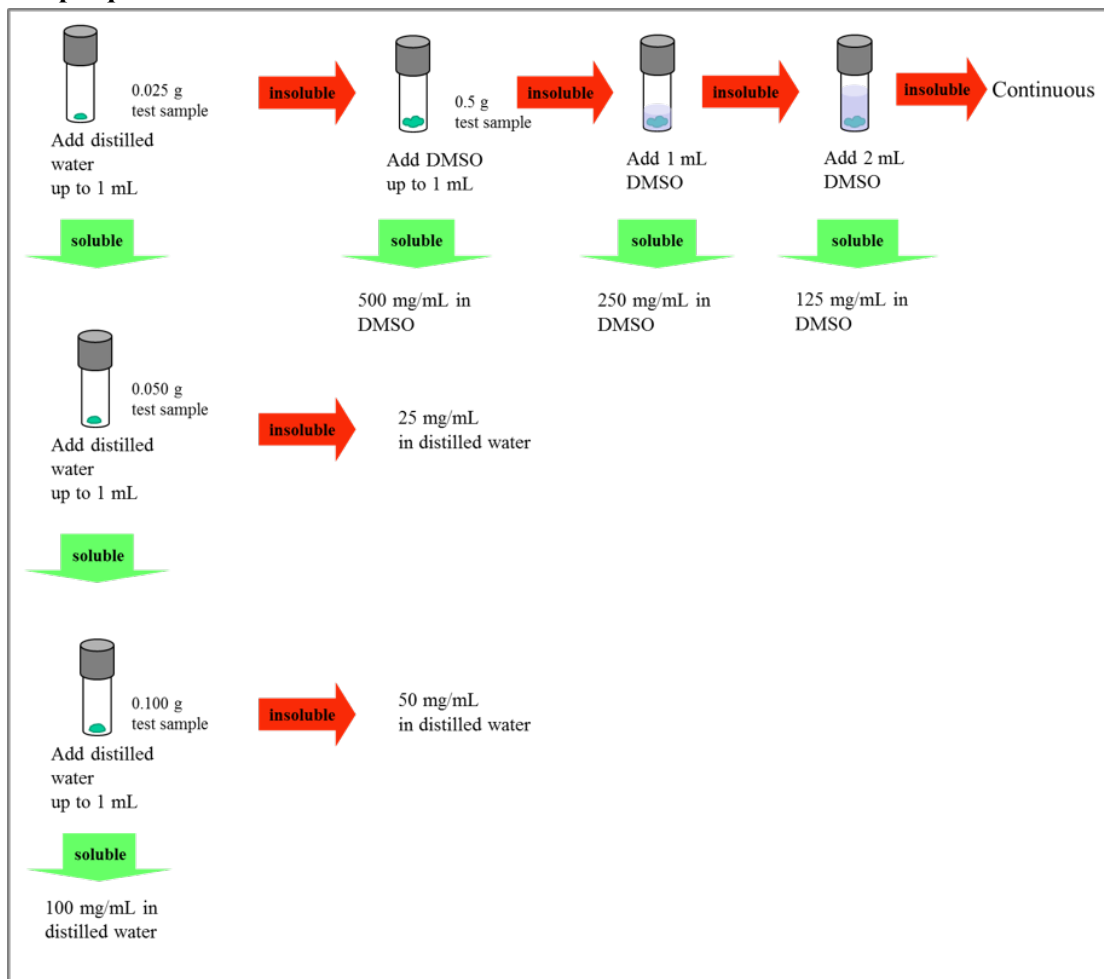
Tableau 1. Substances recommandées pour apporter la preuve de la compétence technique dans le cas de la méthode IL 2\_Luc

N°	Nom chimique	N° CAS	Cible les lymphocytes T	État physique	Plage de référence en µg/mL CV05 <sup>1</sup>	Plage de référence en µg/mL MIT <sup>2</sup>
1	Dexaméthasone	50-02-2	Oui	Solide	> 2000	16-63
2	Ciclosporine	59865-13-3	Oui	Solide	> 1	0.002-0.006
3	Acétate de plomb(II) trihydraté	6080-56-4	Oui	Solide	> 2000	31-63
4	Indométacine	53-86-1	Oui	Solide	500-2000	16-63
5	Acide perfluorooctanoïque	335-67-1	Oui	Solide	250-1000	8-31
6	Chlorure de tributylétain	1461-22-9	Oui	Liquide	0.5-1.0	0.12-0.24
7	Zirame (diméthylthiocarbamate de zinc)	137-30-4	Non	Solide	1-4	> 2000
8	Mannitol	69-65-8	Non	Solide	> 2000	> 2000
9	Acétonitrile	75-05-8	Non	Liquide	> 2000	> 2000

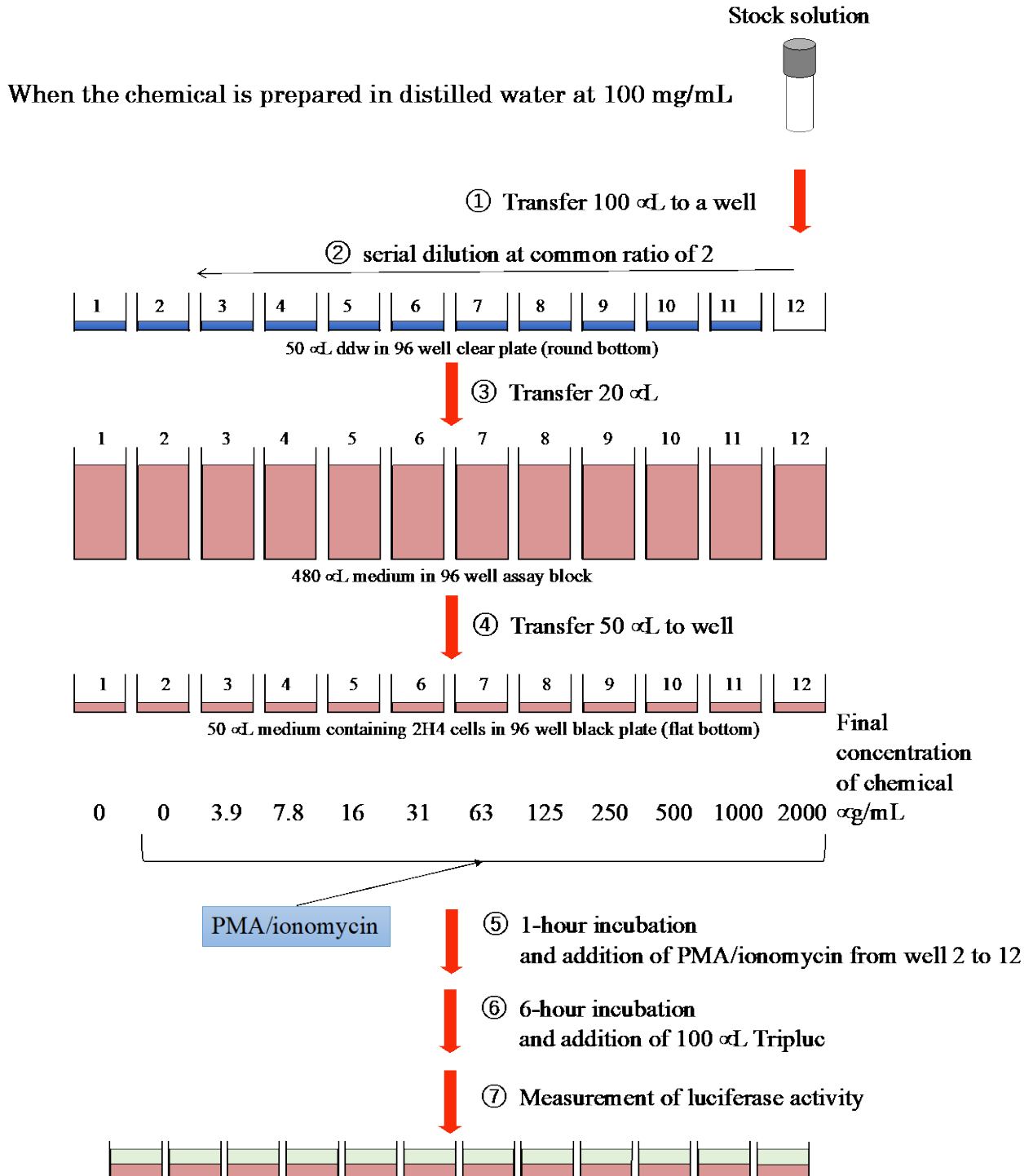
Abréviations : N°CAS = Numéro d'enregistrement au *Chemical Abstracts Service*

# APPENDICE IV - DISSOLUTION DES PRODUITS CHIMIQUES DE L'ESSAI IL 2 LUC.

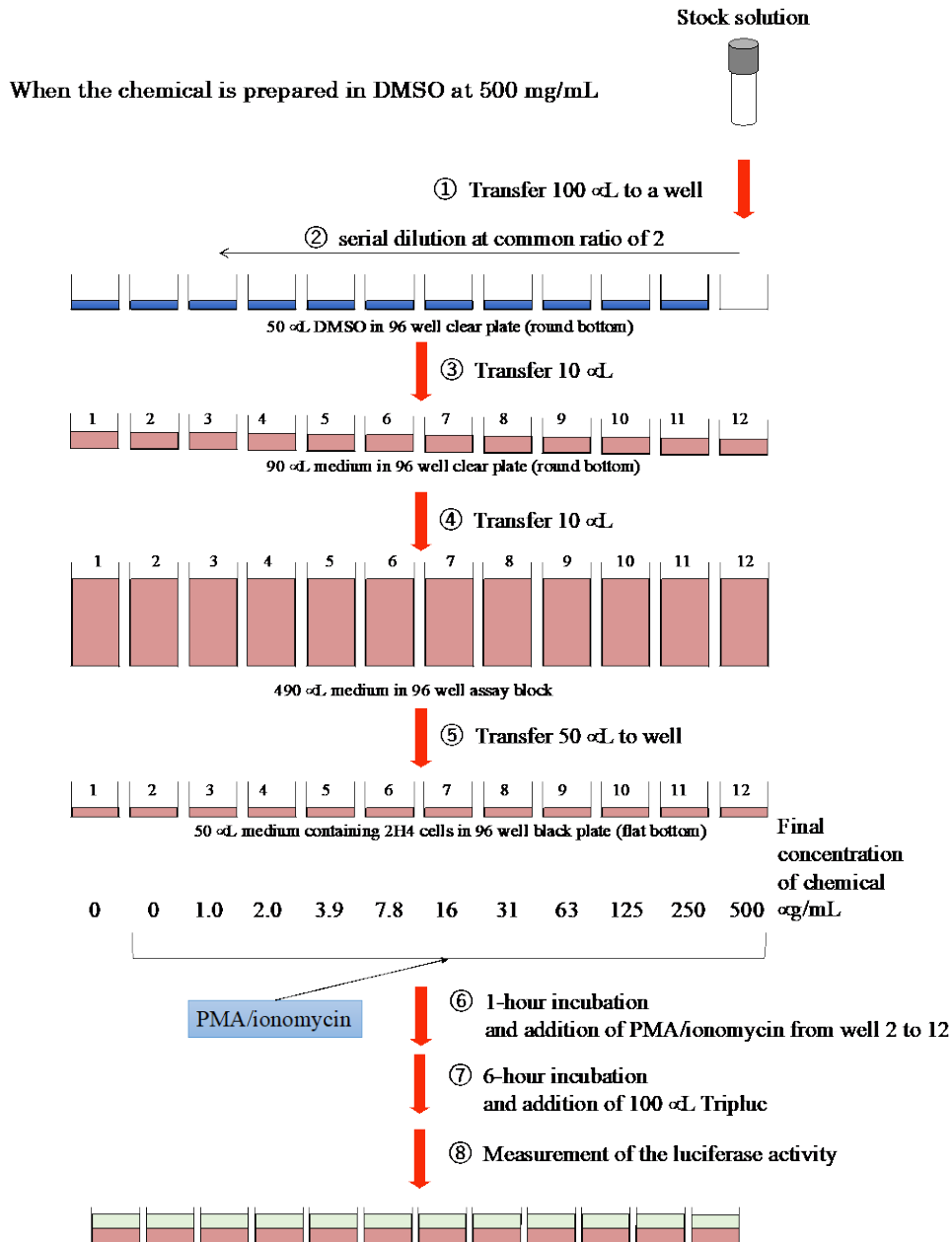
Graphique 1. Dissolution dans le véhicule



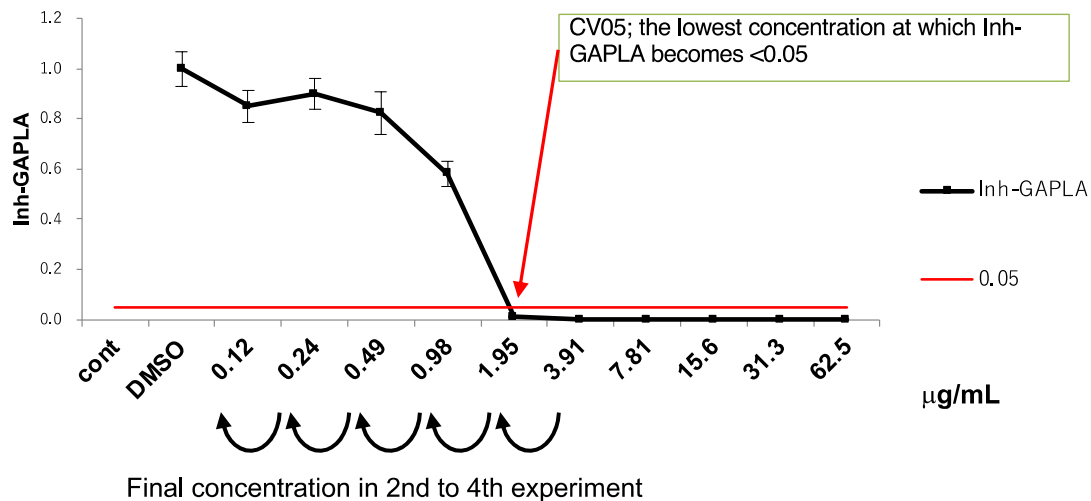
Graphique 2. Schéma de la procédure à suivre lorsque le produit chimique est préparé dans l'eau distillée à une concentration de 100 mg/mL.



Graphique 3. Schéma de la procédure à suivre lorsque le produit chimique est préparé dans le DMSO à une concentration de 500 mg/mL.



Graphique 4. Détermination de la concentration des produits chimiques d'essai lors des épreuves suivantes (deuxième, troisième et quatrième épreuves).



# APPENDICE V - INDICES ET CRITÈRES DE JUGEMENT

## IL2LA

On utilise le j-ème réplicat ( $j = 1$  à  $4$ ) de la i-ème concentration  $i$  ( $i = 0$  à  $10$ ) pour calculer IL2LA et GAPLA, respectivement. La valeur IL2LA normalisée, appelée nIL2LA, est définie comme suit :

$$nIL2LA_{ij} = IL2LA_{ij} / GAPLA_{ij}$$

Il s'agit de l'unité de mesure de base pour cet essai.

## % inhibition

Le pourcentage d'inhibition est la mesure principale de l'essai : il correspond au rapport entre la moyenne de nIL2LA pour les réplicats à la i-ème concentration et cette valeur à la concentration 0. Il est calculé comme suit :

$$\% \text{ inhibition}_i = \left\{ 1 - \frac{\left(\frac{1}{4}\right) \sum_i nIL2LA_{ij}}{\left(\frac{1}{4}\right) \sum_i nIL2LA_{0j}} \right\} \times 100 \quad (1)$$

Le laboratoire principal a proposé que  $\pm 35$  de la valeur indique une action inhibitrice ou stimulante du produit chimique d'essai. Ce seuil est fixé sur la base d'un examen des données historiques du laboratoire principal. L'équipe de gestion des données a ensuite utilisé cette valeur à toutes les phases de l'étude de validation.

Le principal résultat, % inhibition, est essentiellement le ratio de deux moyennes arithmétiques de nIL2LA comme détaillé dans l'équation (1). Il est possible d'estimer l'intervalle de confiance de 95 % (IC 95 %) du % inhibition à la i-ème concentration.

On interprète la limite inférieure de l'IC 95 % au-dessus de 0 comme le fait que la valeur nIL2LA obtenue à la i-ème concentration est supérieure de façon statistiquement significative à la valeur nIL2LA obtenue à la concentration 0 ; on interprète la limite supérieure de l'IC 95 % en-dessous de 0 comme le fait que la valeur nIL2LA obtenue à la concentration  $i$  est inférieure de façon statistiquement significative à la valeur nIL2LA obtenue à la concentration 0.

L'IC 95 % peut être calculé de plusieurs manières. Dans cet essai, on utilise la méthode delta. Selon ce théorème, l'intervalle de confiance à 95 % est calculé comme suit :

$$\% \text{ inhibition} \pm 100 \times \left\{ Z_{0,975} \times \sqrt{\frac{ET_i^2}{moyenne_0^2} + \frac{moyenne_i^2 \times ET_0^2}{moyenne_0^4}} \right\},$$

où  $moyenne_i$  est la moyenne de nIL2LA à la concentration  $i$ ,  $moyenne_0$  est la moyenne de nIL2LA à la concentration 0,  $ET_i$  est l'écart type de nIL2LA à la concentration  $i$  et  $ET_0$  est l'écart type de nIL2LA à la concentration 0.  $Z_{0,975}$  est le 97.5<sup>e</sup> centile de la distribution normale standard.



**Inh-GAPLA**

La valeur Inh-GAPLA est le rapport entre la valeur GAPLA moyenne du réplicat à la i-ème concentration et la valeur équivalente obtenue à la concentration 0, c'est-à-dire :

$$\text{Inh-GAPLA}_i = \left\{ \left( \frac{1}{4} \right) \times \sum \text{GAPLA}_{ij} \right\} / \left\{ \left( \frac{1}{4} \right) \times \sum \text{GAPLA}_{0j} \right\}$$

Comme GAPLA est le dénominateur de nL2LA, une très faible valeur de GAPLA provoque une très forte variation de nL2LA. Ainsi la valeur du % d'inhibition à la concentration i peut être d'une précision faible si la valeur Inh-GAPLA est extrêmement faible.

***Décision quant au caractère « suppresseur », « stimulant » ou « sans d'effet » des produits chimiques à chaque épreuve***

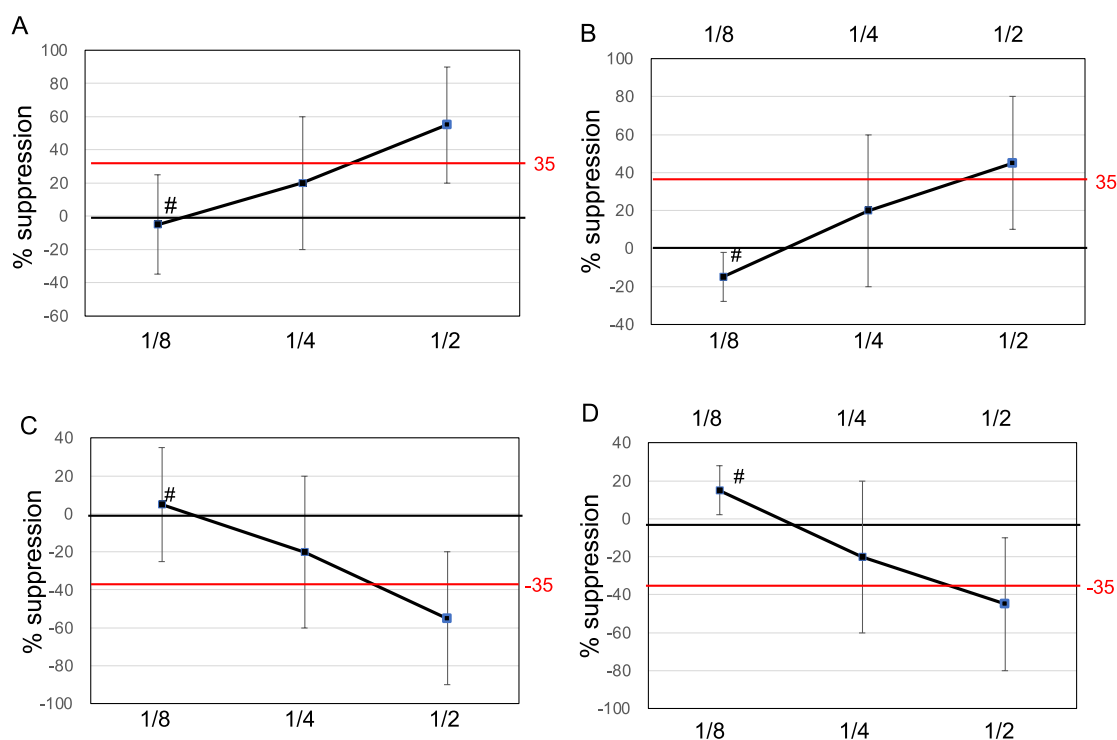
Les critères permettant de juger un résultat positif (qu'il soit suppressif ou stimuloire) sont décrits au paragraphe 34, et illustrés par le graphique 1 ci-dessous, extrait de l'Appendice 17 du rapport de validation.

Le paragraphe 34 mentionne qu'une épreuve est jugée comme positive lorsque les trois critères suivants sont vérifiés :

1. La moyenne du % d'inhibition est  $\geq 35$  (suppresseur) ou  $\leq -35$  (stimulant) et statistiquement significative. La significativité statistique est déterminée avec l'intervalle de confiance de 95 %.
2. L'essai donne lieu à au moins deux résultats consécutifs statistiquement significatifs (hausse ou baisse), ou un résultat statistiquement significatif (hausse ou baisse) avec une même tendance pour au moins trois points de mesure consécutifs (c'est-à-dire que l'on observe une tendance dose-dépendante). Dans ce dernier cas, la tendance peut croiser la valeur 0, tant qu'il n'y a pas plus d'un point de mesure qui ne suit pas la tendance observée et qui ne devient statistiquement significatif pour l'effet opposé. Des graphiques illustrant le critère 2 sont disponibles à l'Appendice V.
3. Les résultats sont évalués en utilisant uniquement des données obtenues à des concentrations auxquelles  $\text{Inh-GAPLA} \geq 0.05$ .

Les six graphiques suivants illustrent des résultats positifs (suppressif ou stimuloires) :





**Graphique 1. Quatre représentations montrant un point positif (augmentation ou diminution) suivi de la même tendance pour au moins trois points consécutifs.**

L'axe des abscisses représente la concentration de produit chimique et l'axe des ordonnées représente le pourcentage de suppression. Chaque plot représente la valeur du pourcentage de suppression d'un essai quadruple avec un intervalle de confiance de 95%. La ligne rouge indique +35 et -35, respectivement. Tous les graphiques montrent un point positif (augmentation ou diminution) avec la même tendance pour au moins trois points consécutifs (c.à.d. la tendance est dépendante de la concentration) et la tendance traverse la ligne 0. Les graphiques A et C sont jugés comme une suppression et une stimulation respectivement, car en effet l'intervalle de confiance de 95% du point indiquant la tendance opposée (#) traverse la ligne 0. En revanche, les graphiques B et D sont jugés comme négatifs parce que l'intervalle de confiance de 95% du point indiquant la tendance opposée (#) ne traverse pas le ligne 0.