



Section 4
Effets sur la santé

Essai n° 456: Essai de stéroïdogenèse H295R

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

Essai de stéroïdogénèse H295R

1. INTRODUCTION

1. L'OCDE a lancé en 1998 une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les Lignes directrices existantes ou établir de nouvelles Lignes directrices concernant le dépistage et l'essai des substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien. Le Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbateurs endocriniens comprend cinq niveaux, chacun d'entre eux correspondant à un degré de complexité biologique différent (1). L'essai de stéroïdogénèse H295R *in vitro* (H295R) décrit dans la présente Ligne directrice (LD) utilise une lignée cellulaire H295R de carcinome surrénalien humain (cellules NCI-H295R) et constitue un « essai *in vitro* fournissant des données mécanistiques » de niveau 2, à des fins de détection et de priorisation. Le développement et la normalisation de l'essai en tant que détecteur des effets des produits chimiques sur la stéroïdogénèse, et en particulier la production de 17 β -œstradiol (E2) et de testostérone (T), ont été réalisés en plusieurs étapes. L'essai H295R a été optimisé et validé (2) (3) (4) (5).

2. L'essai de stéroïdogénèse H295R a pour but de détecter les substances qui influent sur la production d'E2 et de T. Il vise à identifier les xénobiotiques qui ont pour site(s) cible(s) les composantes endogènes constituant la voie biochimique intracellulaire qui conduit, par une suite de réactions, du cholestérol à la production d'E2 et/ou de T. L'essai H295R ne vise pas à identifier les substances qui influent sur la stéroïdogénèse en raison de leurs effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire gonadique (HHG). Il a pour but d'indiquer si, oui ou non, un produit chimique est susceptible d'induire ou d'inhiber la production de T et d'E2 ; il est toutefois possible d'obtenir des résultats quantitatifs dans certains cas (voir paragraphes 53 et 54). Les résultats de l'essai s'expriment par des changements relatifs de la production hormonale par comparaison avec les témoins solvant (TS). L'essai ne vise pas à fournir des informations mécanistiques spécifiques concernant

l'interaction de la substance d'essai avec le système endocrinien. Des recherches ont été conduites au moyen de la lignée cellulaire afin de déterminer les effets sur des enzymes et des hormones intermédiaires particulières comme la progestérone (2).

3. Les définitions et abréviations utilisées dans cette LD pour les essais sont présentées à l'[annexe 1](#). Un protocole détaillé comprenant des instructions sur la façon de préparer les solutions, de cultiver les cellules et d'effectuer divers aspects de l'essai est présenté dans les appendices I à III du document OCDE « *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production* » (4).

2. CONSIDÉRATIONS INITIALES ET LIMITATIONS

4. Cinq enzymes différentes catalysant six réactions différentes interviennent dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes sexuelles. La conversion enzymatique du cholestérol en prégnénolone par l'enzyme de coupure de la chaîne latérale du cholestérol (CYP11A) liée au cytochrome P450 (CYP) constitue l'étape initiale d'une série de réactions biochimiques qui aboutissent à la synthèse des hormones stéroïdiennes finales. Selon l'ordre des deux réactions suivantes, la stéroïdogénèse se divise en deux voies, la voie Δ^5 -hydroxystéroïde et la voie Δ^4 -cétostéroïde, qui convergent dans la production d'androstènedione (figure 1).

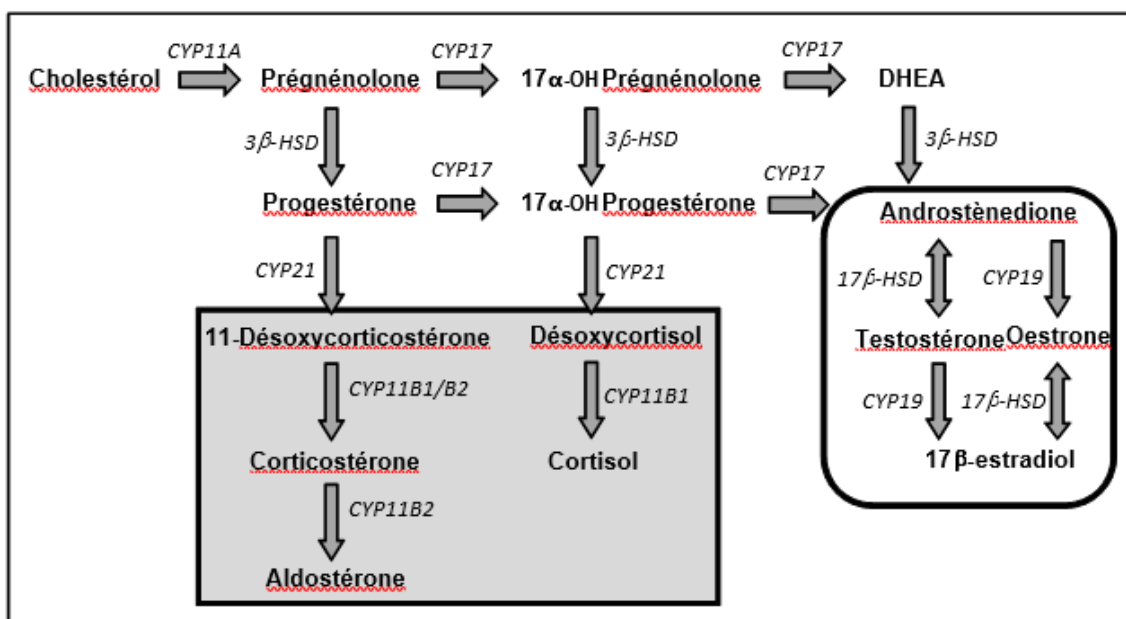
5. L'androstènedione est convertie en testostérone (T) par la *17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase* (17 β -HSD). La testostérone est à la fois une hormone intermédiaire et une hormone finale. Chez les sujets masculins, la T peut être convertie en dihydrotestostérone (DHT) par la *5 α -réductase*, qui se trouve dans les membranes cellulaires, l'enveloppe nucléaire et le réticulum endoplasmique de tissus cibles de l'action androgénique comme la prostate et les vésicules séminales. La DHT est un androgène nettement plus puissant que la T et elle est aussi considérée comme une hormone finale. L'essai H295R ne mesure pas la DHT (voir paragraphe 10).

6. L'enzyme de la voie stéroïdogénique qui convertit les substances androgéniques en substances œstrogéniques est l'*aromatase* (CYP19). La CYP19 convertit la T en *17 β -œstradiol* (E2) et l'androstènedione en œstrone. L'E2 et la T sont considérés comme des hormones finales de la voie stéroïdogénique.

7. La spécificité de l'activité de lyase de la CYP17 diffère entre les espèces pour les substrats intermédiaires. Chez l'homme, l'enzyme favorise les substrats de la voie Δ^5 -hydroxystéroïde (prégnénolone), alors que les substrats de la voie Δ^4 -cétostéroïde (progestérone) sont favorisés chez le rat (19). Ces différences dans l'activité de lyase de la CYP17 expliquent peut-être certaines différences entre les espèces dans la réponse aux substances qui altèrent la stéroïdogénèse *in vivo* (6). Les cellules H295 ont montré qu'elles reflétaient très fidèlement l'expression de l'enzyme surrénalienne chez l'homme adulte et le schéma de production de stéroïdes, mais on sait qu'elles expriment les enzymes des voies Δ^5 -hydroxystéroïde et Δ^4 -cétostéroïde pour la synthèse des androgènes (7) (11) (13) (15).

Figure 1. Voie stéroïdogénique dans les cellules H295R

Les enzymes sont en italique, les hormones en gras et les flèches indiquent la direction de la synthèse. Le fond grisé indique les voies/ produits de la catégorie des corticostéroïdes. Les voies/ produits de la catégorie des stéroïdes sexuels sont entourés d'une courbe. CYP = cytochrome P450 ; HSD = hydroxystéroïde déshydrogénase ; DHEA = déhydroépiandrostérone.



8. La lignée cellulaire H295R de carcinome surrénalien humain est un modèle *in vitro* utile pour l'étude des effets sur la synthèse des hormones stéroïdes (2) (7) (8) (9) (10). La lignée cellulaire H295R exprime les gènes qui codent toutes les enzymes clés pour la stéroïdogénèse mentionnées ci-dessus (11) (15) (figure 1). C'est là une propriété unique car l'expression *in vivo* de ces gènes est spécifique au tissu et au stade de développement : typiquement, aucun tissu ou stade de développement n'exprime à lui seul tous les gènes intervenant dans la stéroïdogénèse (2). Les cellules H295R ont les caractéristiques physiologiques de cellules surrénaliennes fœtales humaines zonalement indifférenciées (11). Ces cellules représentent un système *in vitro* unique en ce qu'elle ont la capacité de produire toutes les hormones stéroïdes que l'on trouve dans le cortex surrénalien adulte et dans les gonades, et permettent de tester les effets sur la synthèse des corticostéroïdes et sur la production d'hormones stéroïdes sexuelles comme les androgènes et œstrogènes, bien que l'essai n'ait été validé que pour la détection de la T et de l'E2. Les changements enregistrés par le système d'essai sous la forme d'une altération de la production de T et d'E2 peuvent être le résultat d'une multitude d'interactions différentes des substances d'essai avec les fonctions stéroïdogéniques exprimées par les cellules H295R. Cela inclut la modulation de l'expression, de la synthèse ou de la fonction des enzymes intervenant dans la production, la transformation ou l'élimination des hormones stéroïdes (12) (13) (14). L'inhibition de la production d'hormones peut être due à une liaison compétitive directe avec une enzyme dans la voie de synthèse, à l'impact sur des cofacteurs comme la NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) et l'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique), et/ou à l'augmentation du métabolisme des stéroïdes ou la suppression de l'expression génique de certaines enzymes dans la voie de la

stéroïdogénèse. Si l'inhibition peut être fonction de processus aussi bien directs qu'indirects intervenant dans la production des hormones, l'induction agit typiquement de manière indirecte, par exemple en touchant des cofacteurs comme la NADPH et l'AMPc (comme dans le cas de la forskoline), en diminuant le métabolisme des stéroïdes (13) et/ou en régulant positivement l'expression des gènes stéroïdogéniques.

9. L'essai H295R présente plusieurs avantages :

- Il permet de détecter aussi bien les augmentations que les diminutions de la production de T et d'E2 ;
- Il permet d'apprécier directement l'impact potentiel d'un produit chimique sur la viabilité des cellules/ la cytotoxicité. C'est là un trait important qui permet de faire la distinction entre les effets dus à la cytotoxicité et ceux dus à l'interaction directe des produits chimiques avec les voies stéroïdogéniques, ce qui n'est pas possible dans les systèmes d'explants de tissus composés de multiples types de cellules de sensibilité et fonctionnalité variables ;
- Il ne nécessite pas l'utilisation d'animaux ;
- La lignée de cellules H295R est commercialement disponible.

10. Les principales limites de l'essai sont les suivantes :

- Sa capacité métabolique est inconnue mais probablement assez limitée ; en conséquence, l'essai ne détectera probablement pas les substances qui doivent être métaboliquement activées.
- Étant dérivée de tissu surrénal, la H295R possède les enzymes capables de produire aussi bien les hormones glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes que les hormones sexuelles ; en conséquence, les effets sur la production de glucocorticoïdes et de minéralocorticoïdes peuvent influencer sur les niveaux de T et d'E2 observés dans l'essai.
- Il ne mesure pas la DHT et ne permet donc pas de détecter les substances inhibant la 5 α -réductase, auquel cas on peut utiliser l'essai de Hershberger (16).
- L'essai H295R ne détecte pas les substances qui interfèrent avec la stéroïdogénèse en affectant l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (HHG), ce qui ne peut être étudié que chez des animaux intacts.

3. PRINCIPE DE L'ESSAI

11. L'essai a pour but la détection des substances qui influent sur la production de T et d'E2. La T est aussi un intermédiaire dans la voie de production de l'E2. L'essai peut détecter les produits chimiques qui inhibent ou induisent typiquement les enzymes de la voie de la stéroïdogénèse.

12. L'essai s'effectue habituellement dans des conditions de culture cellulaire standard, sur des plaques de culture à 24 puits. On peut aussi utiliser d'autres tailles de plaque pour réaliser l'essai ; toutefois, les conditions d'ensemencement et les conditions expérimentales sont ajustées en conséquence pour maintenir la conformité aux critères de performance.

13. Après une période d'acclimatation de 24 h dans les plaques de culture multi-puits, les cellules sont exposées pendant 48 h à sept concentrations du produit chimique d'essai,

au moins en triplicat. Le solvant ainsi qu'un inhibiteur et un inducteur connus de la production des hormones sont employés à une concentration fixe comme témoins négatifs et positifs. À la fin de la période d'exposition, on retire le milieu de chaque puits. Immédiatement après avoir enlevé le milieu, on analyse la viabilité des cellules de chaque puits. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour mesurer la concentration des hormones dans le milieu, notamment les trousseaux commerciaux de dosage des hormones ou des techniques instrumentales comme les systèmes combinés de chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse (CPL-SM). Les données sont exprimées sous la forme d'un facteur multiplicatif de changement (« fold change ») par rapport au témoin solvant et d'une concentration minimale avec effet observé (CMEO). Si l'essai est négatif, la plus forte concentration testée est indiquée sous la dénomination de « concentration sans effet observé » (CSEO). Les conclusions concernant la capacité d'un produit chimique d'influer sur la stéroïdogénèse reposent sur au moins deux exécutions de l'essai indépendantes. La première peut servir à déterminer les ordres de grandeur de concentrations avec un ajustement ultérieur de ces concentrations pour les expériences 2 et 3, le cas échéant, si l'on rencontre des problèmes de solubilité ou de cytotoxicité ou si l'activité du produit chimique semble se situer à l'extrémité de l'intervalle des concentrations testées.

4. PROCÉDURE DE CULTURE

4.1. Lignée de cellules

14. Les cellules NCI-H295R peuvent être obtenues commercialement auprès de l'ATCC (*American Type Culture Collections*), après signature d'un contrat de transfert de matériel¹.

4.2. Introduction

15. Étant donné que la capacité de production d'E2 des cellules évolue à mesure que leur âge/ le nombre de passages en culture (repiquages) augmente (2), il convient de cultiver les cellules suivant un protocole spécifique avant de les utiliser, et de noter le nombre de passages à partir de la décongélation des cellules ainsi que le numéro du passage auquel les cellules ont été congelées et stockées dans l'azote liquide. Le premier chiffre indique le numéro de passage présent et le second le numéro du passage auquel les cellules ont été congelées et stockées. Par exemple, des cellules qui ont été congelées après le passage n°5, et décongelées puis séparées trois fois (4 passages en comptant les cellules juste décongelées comme le passage n°1) après avoir été remises en culture ont le numéro de passage 4.5. On trouvera à l'appendice I du rapport de validation un exemple de système de numérotation (4).

16. On utilise un milieu-mère comme base pour le milieu supplémenté et le milieu de congélation. Le milieu supplémenté est une composante nécessaire pour cultiver les cellules. Le milieu de congélation est spécifiquement conçu pour permettre une congélation des cellules sans impact pour un stockage de longue durée. Avant utilisation, le Nu-Sérum (ou un sérum comparable ayant les mêmes propriétés et dont il a été démontré qu'il produit des données satisfaisant aux exigences de performance de l'essai et au contrôle de qualité (CQ)), qui est un constituant des milieux supplémentés, est analysé pour les concentrations

¹ ATCC CRL-2128 ; ATCC, Manassas, VA, États-Unis, [<http://www.lgcstandards-atcc.org/>].

de fond de T et d'E2. La préparation de ces solutions est décrite à l'appendice II du rapport de validation (4).

17. Après le lancement d'une culture de cellules H295R à partir d'un lot ATCC d'origine, les cellules sont cultivées pour cinq passages (c'est-à-dire qu'elles sont séparées 4 fois). Les cellules du passage cinq sont alors congelées dans l'azote liquide pour stockage. Avant de congeler les cellules, on teste un échantillon des cellules du passage quatre précédent dans une plaque CQ (voir les paragraphes 36 et 37) pour vérifier si la production basale d'hormones et la réponse aux produits témoins positifs satisfont aux critères de CQ de l'essai énoncés dans le tableau 5.

18. Les cellules H295R sont cultivées, congelées et stockées dans l'azote liquide pour qu'il y ait toujours des cellules d'âge ou de passage approprié disponibles pour la culture et l'utilisation. Après la mise en culture d'un lot de cellules nouveau² or congelé³, le nombre maximum de passages acceptable pour l'essai H295R ne dépasse pas 10. Par exemple, pour les cultures de cellules à partir d'un lot congelé au passage 5, les numéros de passage acceptables iraient de 4.5 à 10.5 compris. Pour la préparation des cellules à partir de ces lots congelés, la procédure décrite au paragraphe 19 s'applique. Ces cellules sont cultivées pendant au moins quatre (4) passages supplémentaires (passage 4.5) avant d'être utilisées dans le test.

4.3. Préparation des cellules à partir du stock congelé

19. La procédure de préparation des cellules à partir du stock congelé est utilisée lorsqu'un nouveau lot de cellules est retiré de l'azote liquide pour être cultivé et testé. L'appendice III du rapport de validation (4) décrit cette procédure en détail. Les cellules sont retirées de l'azote liquide, rapidement décongelées, placées dans un milieu supplémenté dans un tube à centrifuger, centrifugées à température ambiante, remises en suspension dans le milieu supplémenté et transférées dans un flacon de culture. Le milieu est changé le jour suivant. Les cellules H295R sont cultivées dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ et le milieu est renouvelé 2 ou 3 fois par semaine. Quand les cellules ont atteint environ 85 à 90 % de confluence, il faut les séparer. Cette séparation est nécessaire pour assurer la santé et la croissance des cellules, et pour les préserver en vue de la réalisation d'essais biologiques. Les cellules sont rincées trois fois à la solution saline tampon phosphate (PBS, sans Ca²⁺ ni Mg²⁺) et libérées du flacon de culture par l'ajout d'une enzyme de décollement appropriée, par exemple la trypsine, dans la PBS (sans Ca²⁺ ni Mg²⁺). Dès que les cellules se décollent du flacon de culture, il faut stopper l'action de l'enzyme en ajoutant le milieu supplémenté dans une proportion de 3 fois le volume utilisé pour le traitement par l'enzyme. On place les cellules dans un tube de centrifugation, on les centrifuge à température ambiante, on enlève le surnageant et on resuspend le culot de cellules dans le milieu supplémenté. On met la quantité appropriée de solution de cellules dans le nouveau flacon de culture. La quantité de solution de cellules est ajustée de telle sorte que les cellules soient confluentes dans les 5 à 7 jours. Le ratio de sous-culture recommandé est entre 1:3 et 1:4. La plaque est soigneusement étiquetée. Les cellules sont alors prêtes à être utilisées dans l'essai et les cellules en excédent sont congelées dans l'azote liquide comme décrit dans le paragraphe 20.

² Un « lot nouveau » est un lot de cellules juste reçu de l'ATCC.

³ Un « lot congelé » correspond à des cellules qui ont été auparavant cultivées puis congelées dans un laboratoire autre que l'ATCC.

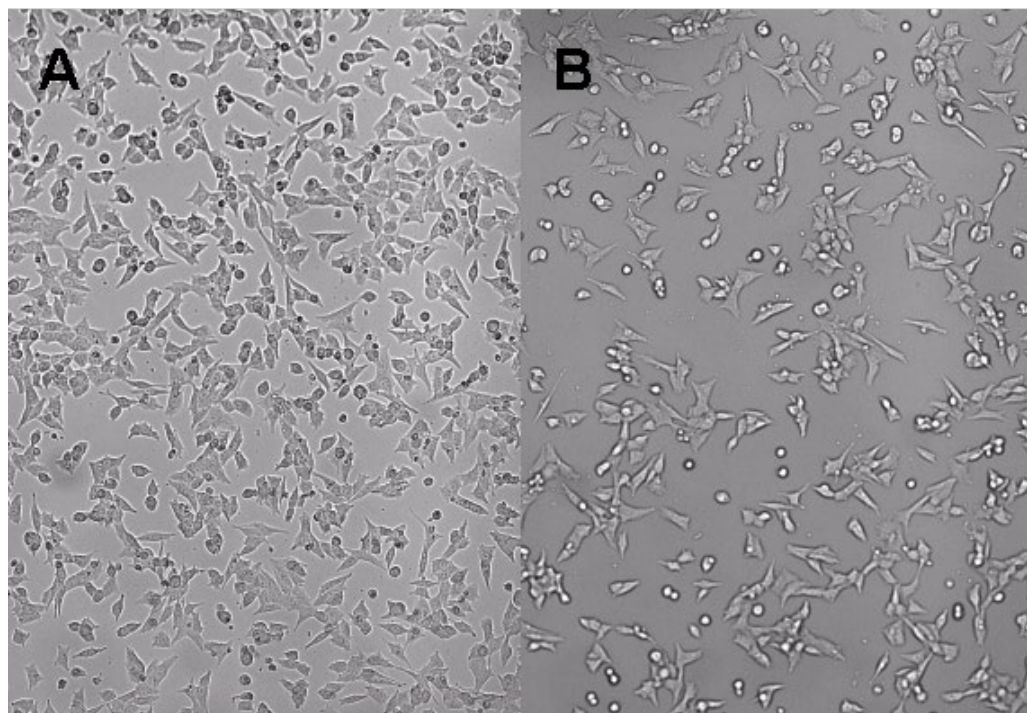
4.4. Congélation des cellules H295R (préparation des cellules pour le stockage dans l'azote liquide)

20. Pour préparer les cellules H295R à la congélation, on suit la procédure décrite ci-dessus pour la séparation des cellules jusqu'à l'étape où l'on resuspend le culot de cellules formé au fond du tube de centrifugation. Ici, on resuspend le culot de cellules dans le milieu de congélation. On transfère la solution dans un flacon cryogénique, on l'étiquette convenablement et on la congèle à -80°C pendant 24 heures, après quoi le flacon cryogénique est transféré vers l'azote liquide pour stockage. L'appendice III du rapport de validation (4) expose les détails de cette procédure.

4.5. Mise en plaque et pré-incubation des cellules pour les tests

21. Le nombre de plaques de 24 puits, préparées comme indiqué dans le paragraphe 19, qui sera nécessaire dépend du nombre de produits chimiques à tester et de la confluence des cellules dans les boîtes de culture. En règle générale, un récipient de culture (75 cm^2) à 80-90 % de confluence fournira suffisamment de cellules pour 1 à 1.5 plaques (de 24 puits) à une densité cible de 200 000 à 300 000 cellules par ml de milieu conduisant à une confluence d'environ 50-60 % dans les puits à 24 heures (figure 2). C'est typiquement la densité de cellules optimale pour la production d'hormones dans l'essai. À de plus hautes densités, le profil de production de la T ainsi que de l'E2 est altéré. Avant de réaliser l'essai la première fois, il est recommandé de tester différentes densités entre 200 000 et 300 000 cellules par ml et de choisir pour les expériences ultérieures la densité conduisant à une confluence de 50-60 % dans les puits à 24 heures.

Figure 2. Photomicrographie de cellules H295R à une densité d'ensemencement de 50 % dans une plaque de culture à 24 puits à 24 heures, au bord (A) et au centre (B) d'un puits.



22. On retire le milieu du flacon de culture à la pipette et on rince 3 fois les cellules à la PBS stérile (sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}). On ajoute une solution d'enzyme (dans la PBS) pour décoller les cellules du flacon de culture. Quand le temps approprié pour le décollement des cellules s'est écoulé, il faut stopper l'action de l'enzyme en ajoutant le milieu supplémenté dans une proportion de 3 fois le volume utilisé pour le traitement par l'enzyme. On place les cellules dans un tube de centrifugation, on les centrifuge à température ambiante, on enlève le surnageant et on resuspend le culot de cellules dans le milieu supplémenté. On calcule la densité de cellules au moyen, par exemple, d'un hémocytomètre ou d'un compteur de cellules. La solution de cellules est diluée à la densité de mise en plaque souhaitée et soigneusement mélangée pour assurer une densité de cellules homogène. Les cellules sont mises en plaque avec 1 ml de solution de cellules par puits et les plaques et puits sont étiquetés. Les plaquesensemencées sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO_2 pendant 24 heures pour permettre aux cellules d'adhérer aux puits.

5. EXIGENCES DE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

23. Il est essentiel que des volumes exacts de solutions et d'échantillons soient introduits dans les puits pendant le dosage parce que ces volumes déterminent les concentrations utilisées dans les calculs des résultats de l'essai.

24. Avant le début de la culture des cellules et tout test ultérieur, chaque laboratoire démontre la sensibilité de son système de mesure des hormones (paragraphes 29-31).

25. S'il est prévu d'utiliser des systèmes de mesure des hormones à base d'anticorps, il faut analyser les produits chimiques à tester en ce qui concerne leur potentiel d'interférence avec le système de mesure utilisé pour quantifier la T et l'E2, comme indiqué dans le paragraphe 32, avant de commencer les tests.

26. Le DMSO est le solvant recommandé pour cet essai. Si l'on utilise un autre solvant, il faut déterminer :

- la solubilité du produit chimique à tester, de la forskoline et du prochloraz dans le solvant, et
- la cytotoxicité en fonction de la concentration du solvant.

Il est recommandé que la concentration maximale admissible de solvant ne dépasse pas une dilution au dixième de la plus faible concentration cytotoxique du solvant.

27. Avant d'effectuer un test pour la première fois, le laboratoire réalise une expérience de qualification démontrant qu'il est capable d'établir et de maintenir les conditions de culture des cellules et les conditions expérimentales appropriées, requises pour tester les produits chimiques, comme il est décrit dans les paragraphes 33 à 35.

28. Quand on commence des tests au moyen d'un lot de cellules nouveau, il faut exécuter un essai sur une plaque de CQ avant l'utilisation du lot afin d'évaluer la performance des cellules, comme il est décrit dans les paragraphes 36 et 37.

5.1. Performance du système de mesure des hormones

5.1.1. Sensibilité, exactitude, précision de la méthode et réactivité croisée avec la matrice de l'échantillon

29. Chaque laboratoire peut utiliser un système de mesure des hormones de son choix pour l'analyse de la production de T et d'E2 par les cellules H295R dès lors qu'il satisfait aux critères de performance, y compris la limite de quantification (LdQ). En principe, elle est de 100 pg/ml pour la T et de 10 pg/ml pour l'E2, sur la base des niveaux de base d'hormones observés dans les études de validation. Toutefois, des niveaux moindres ou plus élevés peuvent être appropriés suivant les niveaux de base d'hormones atteints dans le laboratoire d'exécution. Avant de tester des plaques de CQ et des produits chimiques, le laboratoire démontre que le système qu'il utilisera peut mesurer les concentrations d'hormones dans le milieu supplémenté avec une exactitude et une précision suffisantes pour satisfaire aux critères de CQ spécifiés dans les tableaux 1 et 5 en analysant le milieu supplémenté dopé par un étalon d'hormone interne. Le milieu supplémenté est dopé par au moins trois concentrations de chaque hormone (par exemple, 100, 500 et 2500 pg/ml de T ; 10, 50 et 250 pg/ml d'E2 ; ou on peut utiliser, pour les plus basses concentrations de dopage par la T et l'E2, les concentrations les plus faibles possible sur la base des limites de détection du système de mesure des hormones choisi) et analysé. Il convient que les concentrations d'hormone mesurées des échantillons non extraits ne diffèrent pas de plus de 30 % des concentrations nominales, et que les variations entre les mesures répliquées du même échantillon ne dépassent pas 25 % (voir aussi le tableau 8 pour des critères de CQ additionnels). Si ces critères de CQ sont remplis, on admet que le système de mesure des hormones choisi est suffisamment exact et précis et ne comporte pas de réaction croisée avec les composants du milieu (matrice de l'échantillon) susceptible d'influer significativement sur le résultat de l'essai. Dans ce cas, aucune extraction d'échantillons n'est requise avant la mesure des hormones.

30. Dans le cas où les critères de CQ des tableaux 1 et 8 ne sont pas remplis, il peut y avoir un effet de matrice significatif et il faut effectuer une expérience en procédant à une extraction sur le milieu dopé. L'appendice II du rapport de validation (4) présente un exemple de procédure d'extraction. Les mesures des concentrations d'hormones dans les échantillons extraits sont faites en triple.⁴ Si l'on peut montrer qu'après extraction les composants du milieu n'interfèrent pas avec la méthode de détection des hormones conformément aux critères de CQ, toutes les expériences ultérieures sont conduites au moyen d'échantillons extraits. Si les critères de CQ ne sont pas satisfaits après extraction, le système de mesure des hormones utilisé n'est pas approprié aux besoins de l'Essai de stéroïdogenèse H295R et il faut employer une autre méthode de détection des hormones.

5.2. Courbe standard

31. Les concentrations d'hormones des témoins solvant (TS) se situent dans la partie linéaire de la courbe standard. De préférence, les valeurs de TS sont proches du centre de la partie linéaire de manière à ce qu'on puisse mesurer l'induction et l'inhibition de la synthèse des hormones. Les dilutions du milieu (ou des extraits) à mesurer sont choisies en conséquence. La relation linéaire est déterminée par une méthode statistique appropriée.

⁴ Note : Si l'extraction est nécessaire, on effectue trois mesures répliquées pour chaque extrait. On n'extrait chaque échantillon qu'une seule fois.

5.3. Test d'interférence des produits chimiques

32. S'il est prévu d'utiliser des essais à base d'anticorps comme les méthodes immunoenzymatiques (ELISA) ou radioimmunologiques (RIA) pour mesurer les hormones, il faut tester chaque produit chimique quant à son interférence potentielle avec le système de mesure des hormones qui doit être employé, avant de commencer à effectuer les essais de produits chimiques eux-mêmes [appendice III du rapport de validation (4)] parce que certains de ces produits peuvent interférer avec ces tests (17). S'il se produit une interférence $\geq 20\%$ de la production basale d'hormones pour la T ou l'E2 telle que déterminée par l'analyse des hormones, le « Test d'interférence des produits chimiques avec la mesure des hormones » (décrit dans l'appendice III du rapport de validation (4), section 5.0) est effectué sur toutes les dilutions de solution mère des produits chimiques d'essai afin de déterminer la concentration seuil à partir de laquelle une interférence significative ($\geq 20\%$) se produit. Si l'interférence est inférieure à 30 %, on peut corriger les résultats en conséquence. Si l'interférence dépasse 30 %, les données sont invalides et, à ces concentrations, sont rejetées. Si une interférence significative d'un produit chimique d'essai avec un système de mesure des hormones se produit à plusieurs concentrations non cytotoxiques, il faut utiliser un système de mesure des hormones différent. Pour éviter l'interférence de substances contaminantes, il est recommandé d'extraire les hormones du milieu au moyen d'un solvant approprié ; on trouvera des méthodes possibles dans le rapport de validation (4).

Tableau 1. Critères de performance pour les systèmes de mesure des hormones

Paramètre	Critère
Sensibilité de la méthode de mesure	Limite de quantification (LdQ) T : 100 pg/ml ; E2 : 10 pg/ml ^a
Rendement d'extraction des hormones (seulement quand l'extraction est nécessaire)	Les taux de récupération moyens (sur la base de mesures en triple) pour les quantités d'hormone ajoutées ne montrent pas un écart supérieur à 30 % par rapport à la quantité ajoutée.
Interférence avec les produits chimiques (seulement systèmes à base d'anticorps)	Il convient qu'il n'y ait pas de réactivité croisée importante ($\geq 30\%$ de la production basale d'hormone pour l'hormone considérée) avec aucune des hormones produites par les cellules ^{b, c}

^a Note : Les limites de la méthode de mesure reposent sur les valeurs de la production de base d'hormones présentées dans le tableau 5, et elles ont pour base les performances. Si une plus grande production basale d'hormones peut être atteinte, la limite peut être plus élevée.

^b Certains anticorps de la T et de l'E2 peuvent produire une réaction croisée respectivement avec l'androstènedione et l'œstrone, à un pourcentage plus élevé. Dans ce cas, il n'est pas possible de déterminer exactement les effets sur la 17 β -HSD. Toutefois, les données peuvent néanmoins fournir des informations utiles concernant les effets sur la production d'œstrogènes ou d'androgènes en général. Dans ce cas, les données sont exprimées en réponses androgènes/ œstrogènes au lieu d'E2 et T.

^c C'est-à-dire : cholestérol, prégnénolone, progestérone, 11-désoxycorticostérone, corticostérone, aldostérone, 17 α -prégnénolone, 17 α -progestérone, désoxycortisol, cortisol, DHEA, androstènedione, œstrone.

5.4. Test d'aptitude du laboratoire

33. Avant de tester des substances inconnues, un laboratoire démontre, en effectuant le test d'aptitude, qu'il est capable d'établir et de maintenir les conditions de culture des cellules et les conditions d'expérience appropriées, requises pour conduire convenablement l'essai. Comme la réussite d'un essai est directement liée au personnel de laboratoire qui le conduit, ces procédures sont en partie répétées en cas de changement de personnel.

34. Ce test d'aptitude sera conduit dans les mêmes conditions que celles énoncées dans les paragraphes 38 à 40 en exposant les cellules à 7 concentrations croissantes d'inducteurs et d'inhibiteurs forts, modérés et faibles ainsi qu'à un produit chimique négatif (voir le [tableau 2](#)). Précisément, comme l'indique le [tableau 2](#), les produits chimiques à tester sont la forskoline (n° CAS 66575-29-9), inducteur fort ; le prochloraz (n° CAS 67747-09-5), inhibiteur fort ; l'atrazine (n° CAS 1912-24-9), inducteur modéré; l'aminoglutéthimide (n° CAS 125-84-8), inhibiteur modéré ; le bisphénol A (n° CAS 80-05-7), inducteur faible (production de E2) et inhibiteur faible (production de T) ; et la gonadotrophine chorionique humaine (HCG) (n° CAS 9002-61-3), substance négative. Des plaques distinctes sont testées pour tous les produits chimiques suivant le format présenté dans le [tableau 6](#). Une plaque de CQ ([tableau 4](#), paragraphes 36-37) est incluse à chaque exécution quotidienne pour les produits chimiques du test d'aptitude.

Tableau 2. Produits chimiques du test d'aptitude et concentrations d'exposition.

Produit chimique	Concentrations d'essai [μ M]
<i>Prochloraz</i>	0 ^a , 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10
<i>Forskoline</i>	0 ^a , 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30
<i>Atrazine</i>	0 ^a , 0.03, 0.1, 1, 3, 10, 30, 100
<i>Aminoglutéthimide</i>	0 ^a , 0.03, 0.1, 1, 3, 10, 30, 100
<i>Bisphénol A</i>	0 ^a , 0.03, 0.1, 1, 3, 10, 30, 100
<i>HCG</i>	0 ^a , 0.03, 0.1, 1, 3, 10, 30, 100

^aTémoin solvant (DMSO) (0), 1 μ l DMSO/puits

L'exposition des H295R aux produits chimiques s'effectue dans des plaques à 24 puits durant le test d'aptitude du laboratoire. Le dosage est en μ M pour toutes les concentrations des produits chimiques d'essai. Les concentrations sont administrées dans le DMSO à 0.1 % (v/v) par puits. Toutes les concentrations d'essai sont testées dans des puits en triple ([tableau 6](#)). On utilise des plaques distinctes pour chaque produit chimique. Une plaque de CQ est incluse à chaque exécution quotidienne.

35. Les analyses de viabilité des cellules et d'hormones sont conduites comme indiqué dans les paragraphes 42 à 46. La valeur seuil (concentration minimale avec effet observé, CME0) et la décision de classification sont enregistrées et comparées aux valeurs du [tableau 3](#). Les données sont considérées comme acceptables si elles satisfont aux conditions du [tableau 3](#) pour la CME0 et la décision de classification.

Tableau 3. Valeurs seuils (CME0) et décisions de classification pour les substances du test d'aptitude

	n° CAS	CME0 [μ M]		Décision de classification	
		T	E2	T	E2
<i>Prochloraz</i>	67747-09-5	≤ 0.1	≤ 1.0	+ ^a (Inhibition)	+ (Inhibition)
<i>Forskoline</i>	66575-29-9	≤ 10	≤ 0.1	+ (Induction)	+ (Induction)
<i>Atrazine</i>	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Induction)	+ (Induction)
<i>Aminoglutéthimide</i>	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibition)	+ (Inhibition)
<i>Bisphénol A</i>	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibition)	+ (Induction)
<i>HCG</i>	9002-61-3	n/a	n/a	Négatif	Négatif

^a +, positif

n/a : non applicable étant donné qu'aucun changement ne doit avoir lieu après l'exposition aux concentrations non cytotoxiques du témoin négatif.

5.5. Plaque de contrôle de qualité

36. La plaque de contrôle de qualité (CQ) est utilisée pour vérifier la performance des cellules H295R dans des conditions de culture standard et pour établir une base de données historique pour les concentrations d'hormone dans les témoins solvant et les témoins positifs et négatifs, ainsi que d'autres mesures de CQ au cours du temps.

- Il faut évaluer la performance des cellules H295R au moyen d'une plaque de CQ pour chaque lot ATCC nouveau ou après utilisation, pour la première fois, d'un stock de cellules précédemment congelé sauf si le test d'aptitude du laboratoire (paragraphe 32-34) a été effectué avec ce lot de cellules.
- Une plaque de CQ fournit une évaluation complète des conditions de l'essai (par exemple, viabilité des cellules, témoins solvant, témoins négatifs et positifs, ainsi que la variabilité intra- et inter-essai) quand on teste les produits chimiques et elle fait partie de chaque exécution de l'essai.

37. Le test de CQ s'effectue dans une plaque à 24 puits et suit les mêmes procédures d'incubation, dosage, viabilité des cellules/ cytotoxicité, extraction des hormones et analyse des hormones décrites dans les paragraphes 38 à 46 pour l'essai des produits chimiques. La plaque de CQ contient des blancs, des témoins solvant et deux concentrations d'un inducteur connu (forskoline, 1, 10 μ M) et d'un inhibiteur connu (prochloraz, 0.1, 1 μ M) de la synthèse de l'E2 et de la T. En outre, on utilise du MeOH dans certains puits comme témoin positif pour l'essai de viabilité/ cytotoxicité. Le [tableau 4](#) présente une description détaillée de la disposition de la plaque. Les critères à satisfaire sur la plaque de CQ sont énoncés dans le [tableau 5](#). Il convient que la production de base d'hormone minimum pour la T et l'E2 soit atteinte dans les témoins solvant et dans les blancs.

Tableau 4. Disposition de la plaque de contrôle de qualité pour tester la performance des cellules H295R non exposées et des cellules exposées à un inhibiteur connu (PRO = prochloraz) et à un inducteur connu (FOR = forskoline) de la production d'E2 et de T

Quand l'expérience d'exposition est terminée et après avoir enlevé le milieu, on ajoute une solution de méthanol à 70 % à tous les puits MeOH pour servir de témoin positif pour la cytotoxicité (voir l'essai de cytotoxicité dans l'appendice III du rapport de validation (4)).

	1	2	3	4	5	6
A	Blanc ^a	Blanc ^a	Blanc ^a	Blanc ^a (+ MeOH) ^b	Blanc ^a (+ MeOH) ^b	Blanc ^a (+ MeOH) ^b
B	DMSO ^c 1 μ l	DMSO ^c 1 μ l	DMSO ^c 1 μ l	DMSO ^c 1 μ l (+ MeOH) ^b	DMSO ^c 1 μ l (+ MeOH) ^b	DMSO ^c 1 μ l (+ MeOH) ^b
C	FOR 1 μ M	FOR 1 μ M	FOR 1 μ M	PRO 0.1 μ M	PRO 0.1 μ M	PRO 0.1 μ M
D	FOR 10 μ M	FOR 10 μ M	FOR 10 μ M	PRO 1 μ M	PRO 1 μ M	PRO 1 μ M

^a Les cellules dans les blancs ne reçoivent que du milieu (pas de solvant).

^b Le méthanol (MeOH) est ajouté **après** que l'exposition est terminée et que le milieu a été retiré de ces puits.

^c Témoin solvant DMSO (1 μ l/puits).

Tableau 5. Critères de performance pour la plaque de contrôle de qualité

	T	E2
Production de base d'hormone dans le témoin solvant (TS)	≥ 5 fois la LdQ	≥ 2.5 fois la LdQ
Induction (10 µM forskoline)	≥ 1.5 fois le TS	≥ 7.5 fois le TS
Inhibition (1µM prochloraze)	≤ 0.5 fois le TS	≤ 0.5 fois le TS

5.6. Contrôle de qualité de la plaque de test

38. En plus des critères afférents à la plaque de CQ, il convient de satisfaire d'autres critères de qualité présentés dans le [tableau 8](#) concernant les variations acceptables entre les puits répliqués, les expériences répliquées, la linéarité et la sensibilité des systèmes de mesure des hormones, la variabilité des mesures d'hormone répliquées d'un même échantillon, et le pourcentage de récupération des dopages d'hormone après extraction du milieu (le cas échéant ; voir le paragraphe 30 concernant les conditions dans lesquelles une extraction est requise). Pour être prises en compte dans la suite de l'évaluation, il convient que les données se situent à l'intérieur des intervalles acceptables définis pour chaque paramètre. Si ce n'est pas le cas, il convient de noter dans la feuille de travail que les critères de CQ n'ont pas été remplis pour l'échantillon en question, et de ré-analyser cet échantillon ou de le retirer de l'ensemble de données.

Tableau 6. Intervalles et/ ou variation (%) acceptables pour les paramètres des plaques de test de l'essai H295R. LdQ : Limite de quantification du système de mesure des hormones.

CV : Coefficient de variation ; TS : Témoin solvant ; DPM : Désintégrations par minute.

	Comparaison	T	E2
Production de base d'hormone dans les TS	Facteur multiplicatif par rapport à la LdQ	≥ 5 fois	≥ 2.5 fois
Expériences d'exposition – CV intra-plaque pour les TS (puits répliqués)	Concentrations absolues	≤ 30 %	≤ 30 %
Système de mesure des hormones – CV des mesures répliquées pour les TS ^a	Concentrations absolues	≤ 25 %	≤ 25 %
Extraction du milieu – Récupération de l'étalon ³ H interne (le cas échéant)	DPM	≥ 65 % du nominal	

^a Mesures répliquées d'un même échantillon

6. PROCÉDURE D'EXPOSITION AUX PRODUITS CHIMIQUES

39. On retire les cellules pré-incubées de l'incubateur (paragraphe 21) et on les vérifie au microscope pour s'assurer qu'elles sont en bon état (attachement, morphologie) avant le dosage.

40. On place les cellules dans une enceinte de biosécurité, on enlève le milieu supplémenté et on le remplace par un nouveau milieu supplémenté (1 ml/puits). Le DMSO est le solvant préconisé pour la présente LD. Au cas où il y aurait des raisons d'utiliser d'autres solvants, il faut en présenter la justification scientifique. On expose les cellules au produit chimique d'essai en ajoutant 1 µl de la solution mère appropriée dans le DMSO (voir l'appendice II du rapport de validation (4)) pour 1 ml de milieu supplémenté (volume du puits). Il en résulte une concentration finale de 0.1 % de DMSO dans les puits. Pour garantir un mélange adéquat, on préfère généralement que la solution mère appropriée du produit chimique d'essai dans le DMSO soit mélangée avec le milieu supplémenté pour obtenir la concentration finale souhaitée pour chaque concentration, et que le mélange soit ajouté dans chaque puits immédiatement après avoir enlevé l'ancien milieu. Si l'on choisit cette option, il convient que la concentration de DMSO (0.1 %) reste la même pour tous les puits. Les puits contenant les deux plus fortes concentrations sont examinés visuellement pour détecter la formation de précipités ou d'une opacité indiquant une solubilité incomplète de la substance d'essai, au moyen d'un microscope stéréoscopique. Si on observe ce phénomène (opacité, formation de précipités), on examine aussi les puits contenant la concentration immédiatement inférieure (et ainsi de suite) et il faut exclure de la suite de l'évaluation et de l'analyse les concentrations non complètement dissoutes. On remet la plaque dans l'incubateur à 37°C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 48 heures. Le [tableau 6](#) montre la disposition de la plaque pour les produits chimiques d'essai. Les désignations « stock 1 » à « stock 7 » montrent l'emplacement des concentrations croissantes du produit chimique d'essai.

Tableau 7. Disposition des doses pour l'exposition des cellules H295R aux produits chimiques d'essai dans une plaque à 24 puits

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Stock 4	Stock 4	Stock 4
B	Stock 1	Stock 1	Stock 1	Stock 5	Stock 5	Stock 5
C	Stock 2	Stock 2	Stock 2	Stock 6	Stock 6	Stock 6
D	Stock 3	Stock 3	Stock 3	Stock 7	Stock 7	Stock 7

41. Après 48 heures on retire les plaques d'exposition de l'incubateur et on examine tous les puits au microscope pour observer l'état des cellules (attachement, morphologie, degré de confluence) et les signes de cytotoxicité. On divise le milieu de chaque puits en deux parties égales (environ 490 µl chacune) et on les transfère dans deux fioles distinctes convenablement étiquetées (c'est-à-dire qu'une aliquote fournit un échantillon de réserve pour chaque puits). Pour éviter que les cellules ne sèchent, on retire le milieu, un rang ou une colonne à la fois, et on le remplace par le milieu de l'essai de viabilité des cellules/cytotoxicité. Si l'on ne mesure pas immédiatement la viabilité des cellules/cytotoxicité, on ajoute à chaque puits 200 µl de PBS avec Ca²⁺ et Mg²⁺. On congèle les milieux à -80°C jusqu'aux opérations ultérieures d'analyse des concentrations d'hormone (voir les paragraphes 44-46). La T et l'E2 dans un milieu gardé à -80°C sont généralement stables pendant au moins 3 mois, mais il convient que la stabilité des hormones durant le stockage soit documentée dans chaque laboratoire.

42. Immédiatement après avoir enlevé le milieu, on détermine la viabilité des cellules/cytotoxicité pour chaque plaque d'exposition.

6.1. Détermination de la viabilité des cellules

43. On peut utiliser un essai de viabilité des cellules/ cytotoxicité de son choix pour déterminer l'impact potentiel du produit chimique d'essai sur la viabilité des cellules. Cet essai doit être capable de fournir une mesure exacte du pourcentage de cellules viables présentes dans un puits, ou il convient de démontrer qu'il est directement comparable à/au (une fonction linéaire du) Live/Dead® Assay (voir l'appendice III du rapport de validation (4)). Le test MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium] est un autre essai dont on a montré qu'il fonctionne bien également (18). L'évaluation de la viabilité des cellules au moyen des méthodes précitées est une mesure relative qui ne présente pas nécessairement une relation linéaire avec le nombre absolu de cellules dans un puits. En conséquence, l'analyste effectue parallèlement une évaluation visuelle subjective de chaque puits, et des photos numériques des TS et des deux concentrations non cytotoxiques les plus élevées sont prises et archivées de manière à permettre, si nécessaire, une évaluation ultérieure de la densité exacte des cellules. La densité cellulaire est typiquement plus élevée sur les pourtours du puits comparée à celle du centre du puits, il est donc recommandé d'archiver les photographies de deux ou trois pourtours et de deux ou trois centres des puits. S'il ressort de l'inspection visuelle ou de l'essai de viabilité/cytotoxicité qu'il semble y avoir une augmentation du nombre de cellules, il faut vérifier l'augmentation observée. Si l'augmentation est confirmée, ce point est consigné dans le rapport d'essai. La viabilité des cellules s'exprime par rapport à la réponse moyenne dans les TS, considérée correspondre à 100 % de cellules viables, et est calculée comme il convient selon l'essai de viabilité/toxicité cellulaire utilisé. Pour le test MTT, la formule suivante peut être utilisée:

% de cellules viables = (réponse dans le puits – réponse moyenne dans les puits traités au MeOH [=100 % de cellules mortes]) ÷

(réponse moyenne dans les puits TS – réponse moyenne dans les puits traités au MeOH [=100 % de cellules mortes])

44. Les puits ayant une viabilité inférieure à 80 %, par rapport à la viabilité moyenne dans les TS (=100 % de viabilité), ne sont pas inclus dans l'analyse finale des données. L'inhibition de la stéroïdogénèse qui a lieu en présence de presque 20 % de cytotoxicité nécessite un examen attentif pour s'assurer que la cytotoxicité n'en est pas la cause. Par ailleurs les données doivent être consignées si la viabilité cellulaire excède 120% afin d'identifier les résultats faux positifs.

6.2. Analyse des hormones

45. Chaque laboratoire peut utiliser un système de mesure des hormones de son choix pour l'analyse de la T et de l'E2. On peut utiliser les aliquotes de réserve du milieu provenant de chaque groupe de traitement pour préparer des dilutions amenant la concentration dans la partie linéaire de la courbe standard. Comme indiqué dans le paragraphe 29, chaque laboratoire démontre la conformité de son système de mesure des hormones (par exemple, ELISA, RIA, CPL-SM, CPL-SM/SM) aux critères de CQ en analysant le milieu supplémenté dopé par un étalon d'hormone interne avant d'effectuer des essais de CQ ou de tester des produits chimiques. Pour s'assurer que les composants du système de test n'interfèrent pas avec la mesure des hormones, il peut être nécessaire d'extraire les hormones des milieux avant de les mesurer (voir le paragraphe 30 pour les conditions dans lesquelles une extraction est ou non requise). Il est recommandé d'effectuer l'extraction suivant les procédures de l'appendice III du rapport de validation (4).

46. Si l'on utilise une trousse de test commerciale pour mesurer la production d'hormones, l'analyse des hormones est conduite comme spécifié dans les manuels fournis par le fabricant. La plupart des fabricants ont leur propre procédure de conduite des analyses d'hormones. Il faut ajuster les dilutions des échantillons de telle sorte que les concentrations d'hormone attendues pour les témoins solvant se situent au centre de la partie linéaire de la courbe standard de l'essai considéré (appendice III du rapport de validation (4)). Les valeurs en dehors de la partie linéaire de la courbe standard sont rejetées.

47. Les concentrations finales d'hormone se calculent comme suit :

Exemple:

Extrait :	450 µl de milieu
Reconstitué dans :	250 µl de tampon de l'essai
Dilution dans l'essai :	1:10 (pour amener l'échantillon dans la partie linéaire de la courbe standard)
Concentration d'hormone dans l'essai :	150 pg/ml (déjà ramené à la concentration par ml d'échantillon testé)
Récupération :	89 %
Concentration finale d'hormone = (Concentration d'hormone (par ml) × récupération) (facteur de dilution)	
Concentration finale d'hormone = (150 pg/ml) ÷ (0.89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936.3 pg/ml	

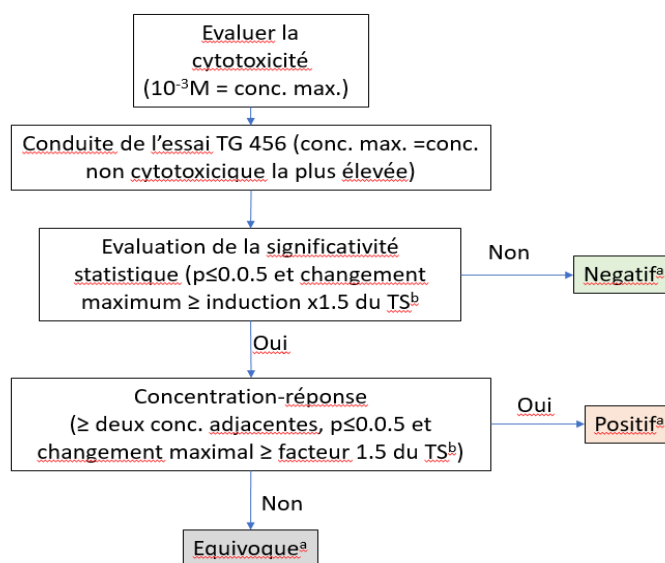
6.3. Procédure de choix des concentrations de test sur la base de l'évaluation d'une exécution indépendante

48. Les critères de détermination d'une exécution positive, négative ou équivoque sont fournis dans la Figure 3. On procède à au moins deux exécutions indépendantes de l'essai. À moins que des informations antérieures, par exemple sur les limites de solubilité ou la cytotoxicité, fournissent une base pour le choix des concentrations d'essai, il est recommandé d'espacer les concentrations d'essai pour l'exécution initiale par des intervalles \log_{10} , avec une concentration maximum de 10^{-3} M. Si le produit chimique est soluble et non cytotoxique aux concentrations d'essai, et que la première exécution a été négative pour toutes les concentrations, cela est confirmé par une nouvelle exécution dans les mêmes conditions que la première (tableau 7). Si les résultats de la première exécution sont équivoques ou positifs, le test est répété comme l'indique le tableau 7 et le graphique 3 en affinant les concentrations d'essai choisies. Les concentrations d'essai dans les exécutions 2 et 3 (le cas échéant) sont ajustées sur la base des résultats de l'exécution initiale en affinant les concentrations qui ont généré un effet par un espacement $\frac{1}{2}$ -log (par exemple, si l'exécution initiale avec 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 µM a eu pour résultat une induction à 1 et 10 µM, les concentrations à tester à la deuxième exécution sont 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 µM), à moins qu'il ne faille employer des concentrations plus faibles pour trouver une CMEO. Dans ce dernier cas, il faut utiliser à la deuxième exécution au moins cinq concentrations au-dessous de la concentration la plus faible testée à la première exécution, avec une échelle $\frac{1}{2}$ -log. Si la deuxième exécution ne confirme pas la première, il faut exécuter une troisième expérience en revenant aux conditions initiales. Des résultats équivoques à la première exécution sont considérés comme négatifs si l'effet observé ne peut être confirmé dans aucune des deux exécutions suivantes. Les résultats équivoques sont considérés comme des réponses positives (effet) si la réponse peut être confirmée dans au moins une exécution supplémentaire à ± 1 incrément de concentration près (voir le paragraphe 55 pour la procédure d'interprétation des données).

Des résultats équivoques dans le premier essai sont considérés négatifs si l'effet observé n'a pas pu être confirmé dans aucun des deux essais suivants. Des résultats équivoques sont considérés comme des réponses (effets) faiblement positives quand la réponse peut être

confirmée dans au moins deux essais supplémentaires comprenant une incrémentation (+/- 1) de la concentration⁵ (voir paragraphe 55 pour la Procédure globale d'interprétation des données et le graphique 3). Une tendance de courbe concentration-réponse non-monotonique est rare mais reste possible. Si des effets reproductible sont observés à des concentrations inférieures, ces données ne devraient pas être ignorées et doivent figurer dans le rapport d'essai.

Figure 3. Vue d'ensemble de la procédure d'interprétation des données d'une exécution indépendante



Notes : a) Ré-exécuter un 2^{ème} ou 3^{ème} essai de confirmation comme indiqué au tableau 7 et paragraphe 47. Abbréviations : conc : concentration, TS : témoin solvant. b) le facteur 1.5 du TS s'applique à l'induction et à l'inhibition, tel que décrit au para graph 55.

Tableau 8. Matrice de décision pour les scénarios de résultats possibles.

Exécution 1		Exécution 2		Exécution 3		Décision
Scénario	Décision	Scénario	Décision	Scénario	Décision	
Negatif	Confirmer ^a	Negatif	Fin			Negatif
Negatif	Confirmer ^a	Positif/ Equivoque ^c	Réexécuter ^b	Negative	Fin	Negatif
Negatif	Confirmer ^a	Positif	Réexécuter ^b	Positive	Fin	Positif
Negatif	Confirmer ^a	Positif	Réexécuter ^b	Equivocal ^c	Fin	Faiblement positif
Negatif	Confirmer ^a	Equivoque ^c	Réexécuter ^b	Positive/ Equivocal ^c	Fin	Faiblement positif
Equivoque ^c	Réexécuter ^b	Negatif	Confirmer ^a	Negative	Fin	Negatif
Equivocal ^c	Réexécuter ^b	Negatif	Confirmer ^a	Positif/ Equivoque ^c	Fin	Faiblement positif
Equivocal ^c	Réexécuter ^b	Equivoque ^c	Confirmer ^a	Equivoque ^c / Positif	Fin	Faiblement positif
Equivocal ^c	Réexécuter ^b	Positif	Fin			Positif

⁵ La raison de tolérer une petite variation de la concentration à laquelle des réponse (effets) significatifs se produisent est due à la variabilité inhérente de l'essai cellulaire.

Positive	Réexécuter ^b	Positif	Fin			Positif
Positive	Réexécuter ^b	Négatif	Confirmer ^a	Positif	Fin	Positif

^a Confirmer l'exécution précédente avec le même plan d'expérience/espacement des concentrations.

^b Réexécuter l'essai avec un espacement ½-log des concentrations (en encadrant la concentration pour laquelle on a observé un effet significatif dans l'expérience précédente).

La raison pour laquelle il est recommandé d'avoir un espacement des concentrations plus faible dans les essais 2 et 3 est dû à une probabilité d'avoir une seule concentration donnant une réponse significative à une incrémentation facteur 10. Si l'exécution de confirmation à une concentration plus faible de ½ log est positive, alors le produit chimique testé est positif. En appliquant un ½ log or même moins d'espacement, cela devrait logiquement montrer un effet à l'une des concentrations, qui serait détecté dans ce processus de décision.

^c Le facteur multiplicatif montre une différence statistiquement significative par rapport au TS.

7. ANALYSE DES DONNÉES ET COMPTE RENDU

7.1. Analyse des données

49. Pour évaluer l'augmentation ou la diminution relative de la production d'hormones chimiquement altérée, il faut normaliser les résultats sur la base de la valeur de TS moyenne de chaque plaque de test et exprimer les résultats sous la forme du changement par rapport aux TS de chaque plaque. Toutes les données sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± 1 écart type.

50. Les données relatives aux hormones ne sont incluses dans l'analyse des données que pour les puits où la cytotoxicité était inférieure à 20 %. Les changements relatifs sont calculés comme suit :

Changement relatif = (Concentration d'hormone dans le puits) \div (Concentration d'hormone moyenne des puits à témoin solvant).

51. S'il ressort de l'inspection visuelle du puits ou de l'essai de viabilité/cytotoxicité décrit dans le paragraphe 42 qu'il semble y avoir une augmentation du nombre de cellules, il faut vérifier l'augmentation observée. Si l'augmentation est confirmée, ce point est consigné dans le rapport d'essai.

52. Avant de conduire des analyses statistiques, il faut évaluer les hypothèses de normalité et d'homogénéité des variances. La normalité est évaluée au moyen de graphiques de probabilités standard ou autre méthode statistique appropriée (par exemple, test de Shapiro-Wilk). Si les données (changements relatifs) ne sont pas distribuées suivant une loi normale, il faut essayer de les transformer de manière à approcher une distribution normale. Si les données suivent ou approchent une distribution normale, il faut analyser les différences entre les groupes de concentration du produit chimique et les TS au moyen d'un test paramétrique (par exemple, test de Dunnett), la *concentration* étant la variable indépendante et la *réponse* (changement relatif) la variable dépendante. Si les données ne suivent pas une distribution normale, il faut utiliser un test non paramétrique approprié (par exemple test de Kruskal-Wallis, test de rangs multiunivoque de Steel). Les différences sont considérées comme significatives à $p \leq 0.05$. Les évaluations statistiques se font sur la base des valeurs moyennes des puits représentant des points de données répliqués indépendants. Il est à prévoir qu'en raison du large espacement des concentrations dans la première exécution (échelle \log_{10}), il ne sera pas possible, dans de nombreux cas, de décrire une relation claire concentration-réponse où les deux concentrations les plus élevées soient dans la partie linéaire de la courbe en S. En conséquence, pour la première exécution ou tout autre ensemble de données dans ce cas (par exemple, quand on ne peut estimer une

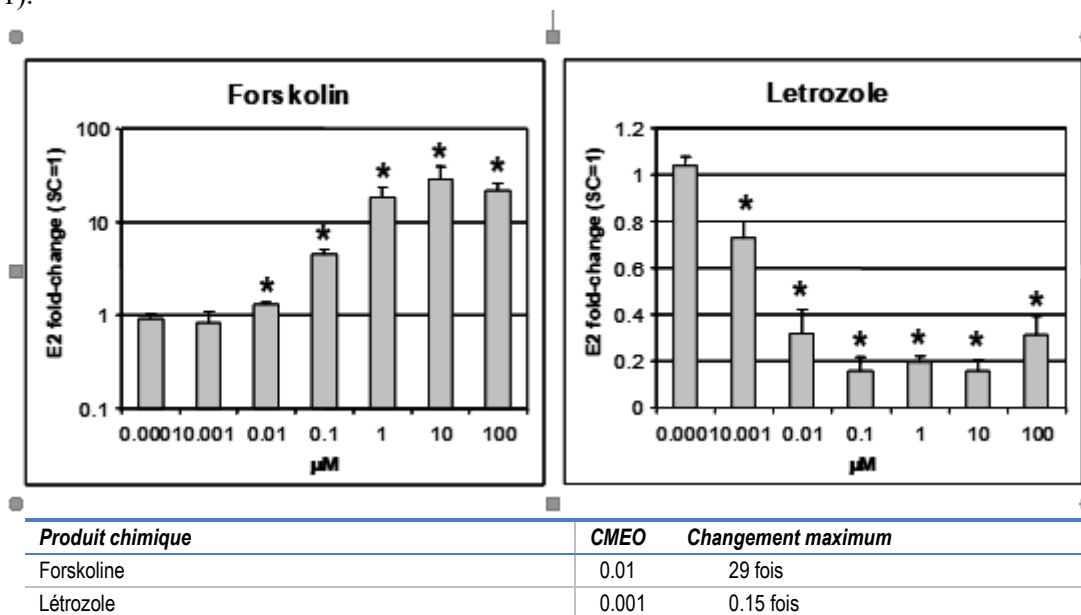
efficacité maximale) on appliquera des statistiques à variable fixe de type I, comme décrit ci-dessus.

53. Si au moins deux points de données se situent dans la partie linéaire de la courbe et si l'on peut calculer les efficacités maximales – comme on le prévoit pour certaines des deuxièmes exécutions effectuées avec un espacement ½-log des concentrations d'exposition – un modèle probit, logit ou autre modèle de régression approprié est utilisé pour calculer les concentrations efficaces (par exemple, CE50 et CE20).

54. Les résultats sont fournis à la fois sous forme graphique (diagramme à barres représentant la moyenne ± 1 écart type) et tabulaire (CME0/ CSEO, direction de l'effet et ampleur maximum de la réponse dans la partie concentration-réponse des données (voir l'exemple de la figure 3). L'appréciation des données n'est considérée comme valable que si elle repose sur au moins deux expériences exécutées indépendamment. Une expérience est considérée comme indépendante si elle a été exécutée à une date différente avec un nouvel ensemble de solutions et de témoins. L'intervalle des concentrations utilisé dans les exécutions 2 et 3 (si nécessaire) peut être adapté à l'appui des résultats de l'exécution 1, afin de mieux définir l'intervalle concentration-réponse contenant la CME0 (voir le paragraphe 47).

Figure 4. Exemple de la présentation et de l'évaluation des données obtenues durant la conduite de l'essai H295R, sous forme graphique et tabulaire

Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives par rapport au témoin solvant ($p < 0.05$). CME0 : concentration minimale avec effet observé ; Changement maximum : ampleur maximum de la réponse observée à une concentration quelconque par rapport à la réponse moyenne des TS (=1).



7.2. Procédure globale d'interprétation des données

55. Un produit chimique est jugé positif si le rapport multiplicatif d'induction ou d'inhibition est statistiquement significatif ($p \leq 0.05$) et supérieur ou inférieur à un seuil de 1.5 d'induction ou d'inhibition par rapport au témoin solvant à deux concentrations

adjacentes dans au moins deux exécutions de l'essai indépendantes (tableau 7). Le facteur seuil de 1.5 s'applique à la fois pour l'accroissement et pour la diminution de la concentration hormonale, c'est-à-dire au-dessus de 150% du témoin solvant et en dessous de 66.7% du témoin solvant. (dans le cas où la cytotoxicité est supérieure ou égale à 80%). Un produit chimique est jugé négatif après deux exécutions négatives indépendantes ou après trois exécutions, dont deux négatives et une équivoque ou positive. Si les données générées dans trois expériences indépendantes ne correspondent à aucun critère de décision énoncé dans le tableau 7, les résultats expérimentaux ne sont pas interprétables. Les résultats à des concentrations qui dépassent les limites de solubilité ou à des concentrations cytotoxiques ne sont pas être inclus dans l'interprétation des résultats.

8. RAPPORT D'ESSAI

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

8.1. Établissement qui a effectué l'essai :

- Nom et adresse de l'établissement
- Directeur de l'étude et autres membres du personnel et leur responsabilité dans l'étude
- Dates de début et de fin de l'étude

8.2. Substance d'essai, réactifs et témoins :

- Identité (nom/ n° CAS le cas échéant), source, numéro de lot, pureté, fournisseur et caractérisation de la substance d'essai, des réactifs et des témoins
- Nature physique et propriétés physicochimiques pertinentes de la substance d'essai
- Conditions de stockage et méthode et fréquence de la préparation de la substance d'essai, des réactifs et des témoins
- Stabilité de la substance d'essai

8.3. Cellules :

- Source et type des cellules
- Nombre de passages des cellules (identifiant de passage de cellules) des cellules utilisées dans l'essai
- Description des procédures d'entretien des cultures de cellules

8.4. Exigences préalables à l'essai (le cas échéant) :

- Description et résultats du test d'interférence du produit chimique avec la mesure des hormones
- Description et résultats des mesures de rendement d'extraction des hormones
- Courbes standard et de calibration pour tous les essais d'analyse à conduire

- Limites de détection pour les essais d'analyse choisis

8.5. Conditions de l'essai :

- Composition des milieux
- Concentration du produit chimique d'essai
- Densité des cellules (concentration des cellules estimée ou mesurée à 24 heures et 48 heures)
- Solubilité du produit chimique d'essai (limite de solubilité, si elle a été déterminée)
- Temps et conditions d'incubation

8.6. Résultats de l'essai :

- Données brutes pour chaque puits pour les témoins et les substances d'essai – chaque mesure répliquée sous la forme des données originales fournies par l'instrument utilisé pour mesurer la production d'hormone (par exemple, densité optique, unités de fluorescence, DPM, etc.)
- Validation de la normalité ou exposé de la transformation des données
- Réponses moyennes ± 1 écart type pour les puits mesurés
- Données de cytotoxicité (concentrations d'essai ayant provoqué la cytotoxicité)
- Confirmation de la conformité aux exigences de CQ
- Changement relatif par rapport au témoin solvant, corrigé de la cytotoxicité
- Diagramme à barres montrant le changement relatif (facteur multiplicatif) à chaque concentration, l'écart type et la signification statistique comme décrit dans le paragraphe 49-54

8.7. Interprétation des données :

- Application de la procédure d'interprétation des données aux résultats et discussion des constatations

8.8. Discussion :

- Ressort-il de l'étude des indications quelconques concernant la possibilité que les données T/E2 puissent subir l'influence d'effets indirects sur la voie des glucocorticoïdes ou des minéralocorticoïdes ?

8.9. Conclusions:

9. RÉFÉRENCES

- OCDE (2002), « Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens », dans l'annexe 2 de : Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques No. 440, Bio-essai utéro-trophique chez les rongeurs : Essai de dépistage à court terme des propriétés oestrogéniques. Disponible à : [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. et Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114-124.
- Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G. et Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies, *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23–30.
- OCDE (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations No. 132, [ENV/JM/MONO\(2010\)31](#), OECD, Paris. Disponible à : [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- OCDE (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, Série de l'OCDE sur les essais et évaluations No. 133, [ENV/JM/MONO\(2010\)32](#), OECD, Paris. Disponible à : [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis. Disponible à : [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]
- Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. et Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.*, 81, 78-89.
- Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. et Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182, 44-54.
- Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. et Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118: 265-272.
- Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. et Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137-1148.
- Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. et La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488-5496.
- He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. et Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578-584.
- Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. et Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for

- evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.*, 39:2777-2785.
- Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. et Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137-1148.
- Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. et Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 731-737.
- OCDE (2009), *Bio-essai de Hershberger sur le rat : Essai de dépistage à court terme de propriétés (anti) androgéniques*, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques No. 441, OECD, Paris. Disponible à : [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- Shapiro, R. et Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222-231.
- Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
- Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*. 38:1598-1606.
- Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro. *J. Appl. Toxicol.*, 26:484-492.

Définitions

CMEO : concentration minimale avec effet observé ; la plus faible concentration à laquelle la réponse de l'essai est statistiquement différente de celle du témoin solvant.

Confluence : couverture ou prolifération permise aux cellules sur ou dans le milieu de culture ou à l'intérieur.

Contrôle de qualité (CQ) : les mesures nécessaires pour s'assurer de la validité des données.

CSEO : concentration sans effet observé ; la plus forte concentration testée si l'essai ne donne pas de réponse positive.

CV : coefficient de variation ; rapport de l'écart type d'une distribution à sa moyenne arithmétique.

CYP : monoxygénases du cytochrome P450 ; famille de gènes et les d'enzymes issues de ces gènes, qui participent à la catalyse de réactions biochimiques variées, et notamment à la synthèse et au métabolisme des hormones stéroïdes.

DPM : désintégrations par minute ; nombre d'atomes dans une quantité donnée de matière radioactive dont la désintégration est détectée par minute.

E2 : 17 β - œstradiol, œstrogène le plus important dans les systèmes mammifères.

Exécution indépendante : expérience indépendante caractérisée par un nouvel ensemble de solutions et de témoins.

H295R : cellules de carcinome surrénalien humain, qui ont les caractéristiques physiologiques de cellules surrénaliennes fœtales humaines zonalement indifférenciées et qui expriment toutes les enzymes de la voie de la stéroïdogénèse. On peut les obtenir de l'ATCC.

LdQ : limite de quantification ; la plus faible quantité d'une substance que l'on peut distinguer de l'absence de cette substance (valeur de blanc) dans une limite de confiance donnée. Pour les besoins de la présente ligne directrice, la LdQ est généralement définie par le fabricant des systèmes d'essai, sauf autre spécification.

Milieu de congélation : utilisé pour congeler et stocker les cellules ; il est constitué de milieu-mère stock auquel sont ajoutés du BD Nu-Serum et du diméthylsulfoxyde.

Milieu supplémenté : milieu-mère stock plus BD Nu-Serum et ITS+ Premix, voir l'appendice II du rapport de validation (4).

Milieu-mère : base de la préparation d'autres réactifs. Il est constitué d'un mélange 1:1 de DMEM (milieu de Eagle modifié par Dulbecco) et de mélange nutritif F-12 de Ham (DMEM/F12) dans du tampon HEPES 15 mM sans rouge de phénol ni bicarbonate de soude. Le bicarbonate de soude est ajouté comme tampon, voir l'appendice II du rapport de validation (4).

Partie linéaire : partie de la courbe standard d'un système de mesure d'hormone où les résultats sont proportionnels à la concentration de l'analyte présent dans l'échantillon.

Passage (repiquage) : nombre de fois où les cellules sont séparées à partir de la mise en culture de cellules d'un stock congelé. Le passage initial à partir du stock congelé est numéroté « passage 1 ». Les cellules séparées 1 fois sont numérotées « passage 2 », etc.

PBS : solution saline tampon phosphate de Dulbecco.

Plaque de contrôle de qualité : plaque à 24 puits contenant deux concentrations des témoins positifs et négatifs pour contrôler la performance d'un lot de cellules nouveau ou fournir les témoins positifs pour l'essai quand on teste les produits chimiques.

Plaque de test : plaque sur laquelle les cellules H295R sont exposées aux produits chimiques d'essai. Les plaques de test contiennent le témoin solvant et deux produits chimiques d'essai à sept niveaux de concentration en triple.

Stéroïdogénèse : voie de synthèse conduisant du cholestérol aux diverses hormones stéroïdes. Plusieurs intermédiaires de la voie de synthèse des stéroïdes comme la progestérone et la testostérone sont des hormones importantes en elles-mêmes mais elles servent aussi de précurseurs à des hormones en aval.

T : testostérone ; un des deux androgènes les plus importants dans les systèmes mammifères.

Trypsine 1X : solution diluée de l'enzyme trypsine, protéase à sérine pancréatique, utilisée pour décoller les cellules d'une plaque de culture, voir l'Appendice III du rapport de validation (4).