



Section 4  
Effets sur la santé

**Ligne directrice n° 458**  
Essai d'activation transcriptionnelle  
faisant intervenir le récepteur des  
androgènes humain transfecté de  
façon stable pour la détection de  
l'activité androgénique agoniste  
et antagoniste des produits  
chimiques

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*

Essais de transactivation médiée par les récepteurs des androgènes relative à des méthodes  
in vitro analogues

**Table of Contents**

<i>LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES</i>	1
Introduction générale	2
Bibliographie	5
Annex A. Définitions et abréviations	6
Annex B. Informations relatives aux trois méthodes d'essai	12
Annex C. (méthode 1) Essai de transactivation médiée par les récepteurs des androgènes visant la détection de l'activité androgénique agoniste et antagoniste des produits chimiques et utilisant la lignée cellulaire avec AR humain AR-EcoScreen™ obtenue par transfection stable	27
Annex D. (méthode 2) Essai de transactivation médiée par les récepteurs des androgènes visant la détection de l'activité androgénique agoniste et antagoniste des produits chimiques et utilisant la lignée cellulaire humaine AR-CALUX® obtenue par transfection stable	51
Annex E. (méthode 3) Essai de transactivation médiée par les récepteurs des androgènes visant la détection de l'activité androgénique agoniste et antagoniste des produits chimiques et utilisant la lignée cellulaire humaine 22Rv1/MMTV_GR-KO obtenue par transfection stable	73

## Introduction générale

1. Le système endocrinien peut être perturbé par divers mécanismes, notamment une interférence avec : (i) l'action hormonale médiée par des récepteurs nucléaires liés au système endocrinien, (ii) la production d'hormones par les enzymes stéroïdogènes ou d'autres, (iii) l'activation ou l'inactivation métabolique des hormones, (iv) la distribution hormonale vers les tissus cibles, et (v) l'élimination des hormones de l'organisme. La présente Ligne directrice pour les essais (LD) porte exclusivement sur l'activation et l'inhibition transcriptionnelles d'un gène rapporteur régulé par les androgènes.

2. Il convient de ne pas directement extrapoler les résultats des méthodes décrites dans la présente LD aux mécanismes *in vivo* complexes de régulation androgénique qui caractérisent tout processus cellulaire ou physiologique.

3. La présente LD décrit la méthodologie appliquée pour conduire des essais d'activation transcriptionnelle (transactivation) médiée par les récepteurs des androgènes (AR) visant à détecter les produits chimiques agonistes et antagonistes. Elle comprend plusieurs méthodes, analogues sur les plans mécanistique et fonctionnel, de détection des agonistes et antagonistes des récepteurs des androgènes. Les méthodes de référence entièrement validées décrites dans la présente LD sont les suivantes :

- La méthode AR-EcoScreen™ utilisant la lignée cellulaire AR-EcoScreen™ (1) (méthode 1, voir l'annexe C)
- La méthode AR-CALUX® utilisant la lignée cellulaire AR-CALUX® (2) (méthode 2, voir l'annexe D)
- La méthode ARTA utilisant la lignée cellulaire 22Rv1/MMTV\_GR-KO (3) (méthode 3, voir l'annexe E)

4. Ces trois méthodes d'essai visent à produire le même effet, à savoir l'activation transcriptionnelle d'un gène rapporteur par un récepteur des androgènes lié à un ligand (voir les paragraphes 5 et 6). L'annexe B donne une vue d'ensemble de leurs similitudes et de leurs différences (tableaux B.1 et B.2). Ces trois méthodes d'essai nécessitent l'utilisation de plaques 96 puits, même si une application à haut débit a également été signalée (mais pas encore validée selon le document-guide n° 34 de l'OCDE, 2020) pour la méthode d'essai AR-CALUX® (4). La méthode 1 comprend un contrôle de la spécificité pour la détection de l'agoniste mais pas de l'antagoniste, tandis que les méthodes 2 et 3 comprennent un contrôle de la spécificité pour la détection de l'antagoniste afin de donner l'assurance que ce qui est mesuré est un antagoniste compétitif. Chaque méthode d'essai a son propre protocole et ses propres critères d'acceptabilité des épreuves. Chaque méthode d'essai a ses propres critères d'interprétation des données pour conclure sur l'activité agoniste et antagoniste.

### **Rappel des faits et principes des méthodes d'essai incluses dans la présente Ligne directrice pour les essais**

5. Les méthodes d'essai de transactivation *in vitro* reposent sur la transcription et la traduction d'un gène rapporteur [le gène de la luciférase (noté luc), par exemple] à la suite de la liaison d'un produit chimique à un récepteur spécifique entraînant une activation transcriptionnelle. Différents gènes rapporteurs peuvent

être utilisés dans ce cadre. On a recours à des méthodes d'essai de transactivation pour évaluer de quelle façon l'expression des gènes est régulée par des récepteurs nucléaires spécifiques, comme les récepteurs des œstrogènes (ER) et les récepteurs des androgènes (AR) (5) (6) (7) (8). Ces méthodes ont été proposées pour la détection de l'activation transcriptionnelle médiée par des récepteurs nucléaires (5) (6) (9).

6. En se liant au récepteur des androgènes, les agonistes (androgènes) et les antagonistes (antiandrogènes) agissent comme des ligands et peuvent activer ou inhiber la transcription des gènes sensibles aux androgènes. Cette interaction peut avoir des effets indésirables sur la santé, en perturbant les systèmes régulés par les androgènes tels que les mécanismes nécessaires à la prolifération cellulaire, au développement normal du fœtus et aux fonctions reproductives.

7. L'OCDE a lancé en 1998 une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les Lignes directrices pour les essais existantes ou à en établir de nouvelles concernant le criblage et les essais de produits chimiques susceptibles de perturber le système endocrinien. Le Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques susceptibles de perturber le système endocrinien comprend cinq niveaux, chacun d'entre eux correspondant à un degré différent de complexité biologique (10). Les trois méthodes d'essai de transactivation médiée par les AR décrites dans la présente LD sont classées au niveau 2, qui couvre « les essais *in vitro* fournissant des données sur un(e) ou plusieurs mécanismes ou voies d'activité endocrinienne (méthodes relatives aux mammifères et non mammifères) ».

8. Les méthodes d'essai décrites dans la présente LD ne peuvent pas être utilisées seules pour les décisions en matière d'évaluation de la sécurité. Elles fournissent des données sur la relation concentration-réponse des produits chimiques ayant une activité (anti-)androgénique *in vitro*, lesquelles peuvent ensuite servir à des fins de criblage et de priorisation, et aussi renseigner sur les mécanismes d'action dans le cadre d'une approche fondée sur le poids de la preuve.

9. Les études de validation des méthodes d'essai AR-EcoScreen™, AR-CALUX® et 22Rv1/MMTV\_GR-KO ont démontré la pertinence et la fiabilité de ces méthodes (1) (3) (11).

10. L'annexe B donne une vue d'ensemble des principales caractéristiques et des critères d'acceptabilité de chaque méthode d'essai ainsi que des principales abréviations utilisées (tableaux B.1 et B.2). À titre d'information, les tableaux B.3a et B.3b fournissent les résultats obtenus pour les produits chimiques qu'on a soumis à l'essai suivant au moins deux méthodes d'essai de la présente LD. La classification résultante est comparée avec la liste de l'ICCVAM de 2003 (6) (c'est-à-dire, la liste de référence pour la méthode AR-EcoScreen™ qui a été adoptée en 2016) et avec la liste de l'ICCVAM de 2017 récemment mise à jour (12). Dans le cas de l'essai antagoniste, les trois méthodes produisent des résultats concordants. En revanche, dans le cas de l'essai agoniste, la méthode 22Rv1/MMTV\_GR-KO classe quatre produits chimiques de façon non concordante. L'une des raisons pourrait en être les différences entre les lignées cellulaires utilisées dans les trois méthodes d'essai (1, 11, 3). Le produit chimique 17β-œstradiol, connu pour être un agoniste de l'AR, présente bien une activité agoniste avec les trois méthodes d'essai, mais l'activité observée avec la méthode AR-CALUX® est faible.

11. Des informations supplémentaires sur ces produits chimiques ainsi que sur 13 autres produits chimiques soumis à l'essai avec la méthode AR-CALUX® sont disponibles dans les rapports de validation (1, 3, 11).

12. Les définitions générales, les définitions spécifiques et les abréviations utilisées dans les méthodes d'essai de la présente LD figurent à l'annexe A.

### **Démonstration des compétences du laboratoire**

13. Il convient que chaque laboratoire démontre sa capacité à mettre en œuvre la méthode d'essai qu'il a choisie avant de l'utiliser pour tester des produits chimiques dont l'activité est inconnue. Pour démontrer

sa compétence, le laboratoire soumet 8 produits chimiques d'épreuve de compétence à l'essai agoniste (voir le tableau B.4a de l'annexe B) et 9 produits chimiques d'épreuve de compétence à l'essai antagoniste (voir les tableaux B.4b et B.4c de l'annexe B). Cette série d'essais permet également de confirmer la réactivité du système d'essai. Les produits chimiques sont soumis à l'essai au moins deux fois, à des jours différents, et les résultats doivent concorder avec les classements et les valeurs indiqués dans les tableaux B.4a et B.4b. En outre, le laboratoire tient à jour une base de données historiques dans laquelle il conserve les résultats obtenus avec les étalons de référence et les témoins véhicule/solvant pour confirmer la reproductibilité de la méthode d'essai au fil du temps.

### ***Rapport d'essai***

14. Pour l'établissement des rapports d'essai, il convient d'utiliser le modèle fourni pour chaque méthode d'essai à l'annexe B.

## Bibliographie

1. OECD (2016), Validation report of Androgen Receptor (AR) Mediated Stably Transfected Transactivation (AR STTA) Assay to Detect Androgenic and Anti-androgenic Activities. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 241), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
2. Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)androgenic potential using AR-CALUX<sup>®</sup> cells (2019). Available at (<https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2010-07>).
3. Validation Study Report of the 22Rv1/MMTV\_GR-KO ARTA assay (2019). Available at ([http://www.nifds.go.kr/brd/m\\_18/view.do?seq=12486&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm\\_seq\\_1=0&itm\\_seq\\_2=0&multi\\_itm\\_seq=0&company\\_cd=&company\\_nm=&page=1](http://www.nifds.go.kr/brd/m_18/view.do?seq=12486&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1)).
4. Van der Burg, B., Pieterse, B., Buist, H., Lewin, G., van der Linden, S.C., Man, H.Y., Rorije, E., Piersma, A.H., Mangelsdorf, I., Wolterbeek, A.P., Kroese, E.D., van Vught-Lussemburg, B. (2015). A high throughput screening system for predicting chemically-induced reproductive organ deformities. *Reprod Toxicol* 55, 95-103.
5. EDSTAC (1998), Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final report. Available at (<https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-and-testing-advisory-committee-edstac-final>).
6. ICCVAM (2003), ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays. Available at ([https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/endo\\_docs/edfinalrpt0503/edfinalrpt.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/endo_docs/edfinalrpt0503/edfinalrpt.pdf)).
7. Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E., Clark, G. and Newbold R. (2002). Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *J. Chromat. B.*, 777, 179-189.
8. Sonneveld, E., Riteco, J.A., Jansen, H.J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W.G. and van der Burg, B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89, 173-187.
9. Gray, L.E. Jr. (1998). Tiered screening and testing strategy for xenoestrogens and antiandrogens. *Toxicol. Lett.*, 102-103, 677-680.
10. OECD (2018), Revised Guidance Document No 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, No. 150, OECD Publishing, Paris, e .
11. Validation Study Report on the Performance assessment of the AR-CALUX<sup>®</sup> *in vitro* method (2019). Available at (<https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2010-07>) .
12. Kleinstreuer, N.C., Ceger, P., Watt, E.D., Martin, M., Houck, K., Browne, P., Thomas, R.S., Casey, W.M., Dix, D.J., Allen, D., Sakamuru, S., Xia, M., Huang, R., Judson, R. (2017). Development and Validation of a Computational Model for Androgen Receptor Activity. *Chem Res Toxicol.*, 30(4):946-964

## Annex A. Définitions et abréviations

## Définitions générales et abréviations applicables à toutes les méthodes d'essai de la présente Ligne directrice et aux tableaux de l'annexe B

**Activation transcriptionnelle (également appelée transactivation) :** déclenchement de la synthèse de l'ARNm en réponse à un signal chimique spécifique, comme la liaison d'un androgène à un récepteur des androgènes.

**Activité androgénique :** capacité d'un produit chimique à reproduire l'aptitude d'un ligand à se fixer au récepteur des androgènes et à l'activer.

**Activité anti-androgénique :** capacité d'un produit chimique à inhiber l'action du ligand agoniste médiée par le récepteur des androgènes. L'activité anti-androgénique médiée par l'AR peut être détectée par l'application de la présente Ligne directrice.

**Agoniste :** produit chimique qui se lie à un récepteur spécifique et déclenche une réponse cellulaire. Il reproduit l'action d'un ligand endogène du récepteur en question.

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

**AR :** récepteur des androgènes

**ARE :** élément de réponse aux androgènes

**ATM :** accord de transfert de matériel

**BDS :** BioDetection Systems b.v. (Pays-Bas)

**CAS :** *Chemical Abstracts Service*

**CE<sub>50</sub> :** concentration d'un produit chimique d'essai agoniste à laquelle l'activité induite est égale à 50 % de l'activité maximale.

**CERI :** *Chemicals Evaluation and Research Institute* (Institut d'évaluation et de recherche sur les produits chimiques) (Japon)

**CI<sub>50</sub> :** concentration d'un produit chimique d'essai antagoniste qui inhibe de 50 % l'activité maximale.

**CRISPR-Cas9** (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated 9*) : complexe CRISPR (courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées) et protéine Cas9 associée

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

**CV :** coefficient de variation

**Cytotoxicité :** effets dommageables sur la structure ou les fonctions de la cellule entraînant *in fine* la mort

cellulaire. Ces effets peuvent se traduire par une réduction du nombre de cellules présentes dans le puits à la fin de la phase d'exposition ou une réduction de la capacité à mesurer une fonction cellulaire en comparaison avec le témoin véhicule concomitant.

**DHT** : 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone

**DMSO** : diméthylsulfoxyde

**Épreuve** : sous-partie d'un essai, destinée à évaluer l'action d'un produit chimique sur l'aspect biologique auquel s'intéresse la méthode d'essai. Chaque épreuve constitue une expérience complète réalisée sur des puits en réplicat, en même temps, et avec des cellules qui proviennent de la même réserve de cellules.

**ER** : récepteur des œstrogènes

**ET** : écart-type

**Étalon de référence** : produit chimique utilisé pour démontrer l'adéquation d'une méthode d'essai. Dans la présente Ligne directrice, les étalons de référence sont trois produits chimiques dont deux induisent une réponse positive (une dose-réponse positive ou une réponse positive à une concentration fixe) et un n'induit pas de réponse. L'un des deux produits chimiques qui induisent une dose-réponse positive est le produit chimique de référence.

**Étude** : ensemble des travaux expérimentaux menés aux fins de l'évaluation d'un produit chimique spécifique unique à l'aide d'une méthode d'essai spécifique. Dans la présente Ligne directrice, une étude comprend toutes les étapes, dont les essais de dilution du produit chimique d'essai dans les milieux d'essai, les épreuves (qui peuvent être des épreuves préliminaires ou des épreuves complètes), l'analyse des données, l'assurance qualité, les évaluations de la cytotoxicité, etc. La réalisation d'une étude permet de classer l'activité du produit chimique d'essai vis-à-vis du type de toxicité évalué par la méthode d'essai et de caractériser la réponse par rapport au produit chimique de référence positif.

**FI** : coefficient multiplicateur (facteur) d'induction

**Fiabilité** : mesure dans laquelle la mise en œuvre d'une méthode d'essai peut être reproduite au fil du temps par un même laboratoire ou par plusieurs laboratoires appliquant le même protocole. Pour l'évaluer, on calcule la reproductibilité intra-laboratoire et inter-laboratoires.

**FI<sub>inh</sub>** : coefficient multiplicateur (facteur) d'inhibition

**GR** : récepteur des glucocorticoïdes

**InChI** : identifiant chimique international

**IR** : induction relative

**IUPAC** : *International Union of Pure and Applied Chemistry* (Union internationale de chimie pure et appliquée)

**KO** : *KnockOut* (inactivation)

**Luc** : gène de la luciférase

**MFDS** : *Ministry of Food and Drug Safety* (ministère coréen de la Sécurité des Aliments et des Médicaments)

**Méthode d'essai** : dans le contexte des Lignes directrices, une méthode d'essai est l'une des méthodes reconnues comme valides pour satisfaire aux critères de performance décrits dans les Lignes directrices. Les éléments de la méthode d'essai incluent, par exemple, une lignée cellulaire spécifique avec des conditions de croissance associées, les milieux spécifiques dans lesquels est conduit l'essai, les conditions de préparation des plaques, leur agencement et la dilution des produits chimiques d'essai, et



toute autre mesure obligatoire de contrôle de la qualité ainsi que les étapes d'évaluation de données connexes.

**Méthode d'essai validée** : méthode d'essai ayant fait l'objet d'une étude de validation visant à déterminer sa pertinence (notamment son exactitude) et sa fiabilité à des fins spécifiques. Il importe de noter qu'une méthode d'essai validée peut ne pas présenter les performances suffisantes en termes d'exactitude et de fiabilité pour être jugée acceptable pour les besoins envisagés.

**MMTV** : virus de la tumeur mammaire de la souris

**NIHS** : *National Institute of Health Sciences* (Institut national des sciences de la santé) (Japon)

**PE** : perturbateur endocrinien

**PR** : récepteur de la progestérone

**Produit chimique d'essai** : ce qui est soumis à l'essai, hors travaux conduits pour déterminer l'applicabilité de l'essai aux substances monoconstituants, aux substances multiconstituants ou aux mélanges.

**Produit chimique de référence** : produit chimique utilisé comme base de comparaison avec le produit chimique d'essai.

**PCR** : réaction de polymérisation en chaîn

**R<sup>2</sup>** : carré du coefficient de corrélation (critère pour le contrôle de la spécificité).

**SGH de l'ONU** : Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques des Nations Unies.

**SMILES** : *Simplified Molecular-Input Line-Entry System* (spécification d'écriture moléculaire linéaire simplifiée)

**SVF** : sérum de veau fœtal

**Système d'essai** : tout système biologique, chimique ou physique ou système combinant ces trois aspects utilisé dans une étude. Les systèmes d'essai *in vitro* sont essentiellement des systèmes biologiques (des cellules ou des tissus, par exemple).

**Témoin négatif** : partie d'un système d'essai qu'on a séparée et traitée avec un produit chimique connu pour ne pas faire réagir le système d'essai. Le témoin négatif permet de prouver que le système d'essai ne réagit pas dans les conditions réelles de l'essai.

**Témoin positif** : partie d'un système d'essai qu'on a séparée et traitée avec un produit chimique connu pour faire réagir le système d'essai. Le témoin positif permet de prouver que le système d'essai réagit dans les conditions réelles de l'essai.

**Témoin véhicule** : solvant (véhicule) utilisé pour solubiliser les produits chimiques d'essai et les étalons de référence. Il fait l'objet d'un essai sans solutés.

**Transactivation** : voir *activation transcriptionnelle*.

**URL** : unités relatives de lumière

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

**Validation** : processus permettant d'évaluer la fiabilité et la pertinence d'une approche, d'une méthode, d'un procédé ou d'une évaluation à des fins particulières.

## Terminologie propres aux méthodes d'essai

### Méthode d'essai AR-EcoScreen™

**AGref** : étalon de référence agoniste (500 pM de DHT) dans l'essai antagoniste.

**ATR** : activité transcriptionnelle relative

**BPA** : bisphénol A

**CI<sub>30</sub>** : concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle l'activité mesurée dans un essai antagoniste inhibe de 30 % l'activité maximale induite par 500 pM de DHT sur chaque plaque.

**DCC-FBS (Dextran-Coated Charcoal treated Fetal Bovine Serum)** : sérum de veau fœtal traité au charbon enrobé de dextrane

**DEHP** : phtalate de di-2-éthylhexyle

**HF** : hydroxyflutamide

**RTP<sub>max</sub>** : réponse maximale induite par un produit chimique d'essai, exprimée en pourcentage de la réponse induite par le TP<sub>AGO</sub> (10 nM de DHT) sur une même plaque.

**TP<sub>AGO</sub>** : témoin positif agoniste de l'AR (avec 10 nM de DHT)

**TP<sub>ATG</sub>** : témoin positif antagoniste de l'AR (avec 500 pM de DHT et 1 µM d'HF)

**TP<sub>CT</sub>** : réponse du témoin de cytotoxicité (10 µg/mL de cycloheximide)

**TP<sub>10</sub>** : concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle la réponse dans un essai agoniste est égale à 10 % de la réponse induite par le produit chimique de référence (10 nM de DHT) sur chaque plaque.

**TP<sub>50</sub>** : concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle la réponse dans un essai agoniste est égale à 50 % de la réponse induite par le produit chimique de référence (10 nM de DHT) sur chaque plaque.

**TP<sub>max</sub>** : concentration d'un produit chimique d'essai induisant la réponse RTP<sub>max</sub>.

### Méthode d'essai AR-CALUX®

**CE<sub>10</sub>, CE<sub>50</sub>** : concentration de produit chimique d'essai à laquelle on observe 10 % ou 50 % de sa réponse maximale d'induction

**CE<sub>50</sub> REF** : concentration du produit chimique de référence DHT à laquelle on observe 50 % de sa réponse maximale (essai agoniste).

**CI<sub>20</sub>, CI<sub>50</sub>** : concentration de produit chimique d'essai à laquelle on observe une inhibition de 20 % ou 50 % par rapport à la réponse maximale

**CI<sub>50</sub> REF** : concentration du produit chimique de référence flutamide à laquelle on observe 50 % de sa réponse maximale (essai antagoniste).

**Contrôle de la spécificité** : test visant à évaluer si la réponse antagoniste résulte d'une liaison compétitive à l'AR

**DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium)** : Milieu Eagle modifié de Dulbecco

**Épreuve complète** : expérience menée après l'épreuve préliminaire avec une plus petite étape de dilution (2, 3 ou 5, par exemple) visant à calculer les paramètres avec davantage de précision

**Épreuve préliminaire** : expérience permettant d'évaluer la relation dose-réponse, généralement

réalisée avec une étape de dilution importante (10, par exemple) afin de prendre en compte l'intégralité de la relation dose-réponse (si possible). Elle sert à déterminer la gamme de concentrations à utiliser lors de l'épreuve complète ultérieure.

**FD** : facteur de dilution

**FLU** : flutamide

**FZ** : facteur Z

**hAR** : récepteur des androgènes humain

**HTS** : criblage à haut débit

**IATA** : *Integrated Approach to Testing and Assessment* (approche intégrée des essais et évaluations).  
L'IATA est une approche pragmatique et scientifique utilisée pour la caractérisation des risques chimiques ; elle repose sur une analyse intégrée des informations existantes et sur la production de nouvelles informations à l'aide de stratégies d'essai.

**IR** : induction relative

**LDH** : lactate déshydrogénase

**PI** : propriété intellectuelle

**RTP<sub>10</sub> REF, RTP<sub>50</sub> REF, RTP<sub>80</sub> REF** : niveau de réponse [déterminé par l'induction relative (IR)] du produit chimique de référence DHT ou FLU à 10 %, 50 % ou 80 %.

**RTP<sub>max</sub>** : réponse maximale (induction la plus élevée) du produit chimique d'essai

**RTP<sub>min</sub>** : réponse minimale (inhibition la plus élevée) du produit chimique d'essai

**S<sub>c</sub>** : réponse de contrôle de la spécificité à une concentration spécifique c, exprimée en induction relative

**S<sub>c</sub><sup>n</sup>** : réponse normalisée de contrôle de la spécificité à une concentration spécifique c, exprimée en induction relative

**TP<sub>10</sub>, TP<sub>50</sub>, TP<sub>80</sub>** : concentration de produit chimique d'essai donnant lieu à une induction (ou inhibition) de 10 %, 50 % ou 80 % par rapport à la réponse maximale induite par le produit chimique de référence DHT (essai agoniste) ou le témoin solvant (essai antagoniste).

**TP<sub>max</sub>, TP<sub>min</sub>** : concentration de produit chimique d'essai induisant la réponse maximale (RTP<sub>max</sub>) ou la réponse minimale (RTP<sub>min</sub>).

**TS** : témoin solvant (agoniste : milieu d'essai plus 0.1 % de solvant ; antagoniste : milieu d'essai plus 0.1 % de solvant additionné de la concentration CE<sub>50</sub> de DHT)

**TV** : témoin véhicule (milieu d'essai plus 0.1% de solvant, utilisé dans l'essai antagoniste)

**UA** : unités d'absorption

**Y<sub>c</sub>** : moyenne de la réponse standard **Y<sub>ic</sub>** sur les trois réplicats techniques

**Y<sub>ic</sub>** : réponse standard à la concentration c (C1-C8), exprimée en induction relative et sur un réplicat technique i (1-3)

**Méthode d'essai 22Rv1/MMTV\_GR-KO**

**ATCC** : *American Type Culture Collection*

**ATR** : activité transcriptionnelle relative

**CI<sub>30</sub>** : concentration d'un produit chimique à laquelle sa réponse inhibitrice représente 30 % du niveau maximum de réponse du témoin agoniste de l'AR (800 pM de DHT) dans l'essai antagoniste de l'AR

**Contrôle de la spécificité** : test visant à évaluer si la réponse antagoniste résulte d'une liaison compétitive à l'AR

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

**DEHP** : phtalate de di-2-éthylhexyle

**Épreuve complète** : expérience menée après l'épreuve préliminaire avec une plus petite étape de dilution (3 ou 5, par exemple) visant à calculer les paramètres avec davantage de précision

**Épreuve préliminaire** : expérience permettant d'évaluer la relation dose-réponse, généralement réalisée avec une étape de dilution importante (10, par exemple) afin de prendre en compte l'intégralité de la relation dose-réponse (si possible). Elle sert à déterminer la gamme de concentrations à utiliser lors de l'épreuve complète ultérieure.

**GF-AFC** : glycyphénylalaninyl-aminofluorocoumarin

**KTR** : *Korea Testing and Research Institute* (Institut coréen d'essai et de recherche)

**LSS** : laurylsulfate de sodium

**NIFDS** : *National Institute for Food and Drug Safety Evaluation* (Institut national d'évaluation de la sécurité des aliments et des médicaments)

**Sc** : induction relative d'un produit chimique d'essai à une concentration *c* en cas d'utilisation de 100 nM de DHT dans l'essai antagoniste (contrôle de la spécificité)

**TP<sub>10</sub>** : concentration d'un produit chimique à laquelle sa réponse est égale à 10 % du niveau maximum de réponse du témoin agoniste de l'AR (10 nM de DHT) dans l'essai agoniste de l'AR

**TP<sub>50</sub>** : concentration d'un produit chimique à laquelle sa réponse est égale à 50 % du niveau maximum de réponse du témoin agoniste de l'AR (10 nM de DHT) dans l'essai agoniste de l'AR

**TP<sub>AGO1</sub>** : témoin de l'essai agoniste de l'AR affichant une réponse positive avec 10 nM de DHT

**TP<sub>AGO2</sub>** : témoin agoniste de l'essai antagoniste de l'AR (800 pM de DHT)

**TP<sub>ANTA</sub>** : témoin antagoniste affichant une réponse positive avec 800 pM de DHT et 1 µM de bicalutamide

**TP<sub>CT</sub>** : témoin de cytotoxicité (1 mM de LSS)

**Yc** : induction relative d'un produit chimique d'essai à une concentration *c* en cas d'utilisation de 800 pM de DHT dans l'essai antagoniste

Annex B. Informations relatives aux trois méthodes d’essai

Tableaux récapitulatifs et liste des produits chimiques d’épreuve de compétence

Tableau B.1. Vue d’ensemble des caractéristiques des trois méthodes d’essai de la présente LD

Nom de la méthode d’essai	AR-EcoScreen™	AR-CALUX®	22Rv1/MMTV_GR_KO
Développeur	Otsuka Pharmaceuticals Co, Ltd, CERI et NIHS (Japon)	BioDetection Systems b.v. (BDS) (Pays-Bas)	Ministère de la Sécurité des aliments et des médicaments (MFDS), université de Corée et université de Dongguk (Corée)
Lignée cellulaire	AR-EcoScreen™	AR-CALUX®	22Rv1/MMTV_GR-KO
Type de cellule	cellule cancéreuse d’ovaire de hamster chinois	cellule humaine d’ostéosarcome	cellule épithéliale humaine du cancer de la prostate
Modification génétique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ADNc de l’AR humain</li> <li>• Promoteur de la protéine du stress -4 C3 ARE-luciférase de luciole (<i>Photinus pyralis</i>)</li> <li>• Promoteur SV40 – luciférase de <i>Renilla</i> (<i>Renilla reniformis</i>) (pour la mesure simultanée de la cytotoxicité)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ADNc de l’AR humain</li> <li>• Promoteur TATA -3xARE - luciférase de luciole (<i>Photinus pyralis</i>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AR endogène</li> <li>• Promoteur MMTV LTR contenant l’ARE- luciférase de luciole (<i>Photinus pyralis</i>)</li> <li>• Inactivation du GR par CRISPR-Cas9</li> </ul>
Particularité	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interférence minimale du GR grâce à la sélection d’un ARE approprié</li> <li>• Applicabilité du haut débit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas ou peu d’expression du GR, de l’ER et du PR</li> <li>• Applicabilité du haut débit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas d’expression de l’ER et du PR</li> <li>• Inactivation du GR</li> </ul>

# OECD/OCDE

458

Disponibilité	Accord de transfert de matériel comprenant un accord de licence avec la banque cellulaire JCRB ( <i>Japanese Collection of Research Bioresources</i> ) et le propriétaire des cellules	Accord de licence avec BDS	Accord de transfert de matériel (MTA) auprès de <i>Korean Collection for Type Cultures</i>
---------------	--	----------------------------	--

Tableau B.2. Étalons de référence et critères d'acceptabilité des trois méthodes d'essai pour les propriétés AGONISTES

Nom de la méthode d'essai	AR-EcoScreen™	AR-CALUX®	22Rv1/MMTV_GR-KO
<b>AGONISTE</b>			
Produit chimique de référence	5α-dihydrotestostérone (DHT)	5α-dihydrotestostérone (DHT)	5α-dihydrotestostérone (DHT)
Critères	Plage logTP <sub>50</sub> -11.03/-9.00 (log[M])	Plage CE <sub>50</sub> 1.10 <sup>-10</sup> /1.10 <sup>-9</sup> M	Plage logTP <sub>50</sub> -10.6/-9.0 (log[M])
	Plage logTP <sub>10</sub> -12.08/-9.87 (log[M])		Plage logTP <sub>10</sub> -12.2/-9.7 (log[M])
	Courbe sigmoïde	Courbe sigmoïde	Courbe sigmoïde
	FI TP <sub>AGO</sub> > 6.4 (TP <sub>AGO</sub> : DHT 1.0 x 10 <sup>-8</sup> M)	FI DHT 1.0 x 10 <sup>-7</sup> M > 20	FI TP <sub>AGO</sub> ≥ 13 (TP <sub>AGO</sub> : DHT 1.0 x 10 <sup>-8</sup> M)
	FI TP <sub>10</sub> > 1 + 2ET (induction de TV)		FI TP <sub>10</sub> > 1 + 2ET (induction de TV)
	CV < 20 % dans les puits tripliqués	CV  logCE <sub>50</sub> < 1.5 % FZ > 0.5	
Témoin positif	Mestanolone	17α-méthyltestostérone	Mestanolone
Critères	Plage logTP <sub>50</sub> -10.15/-9.26 (log[M])	IR > 30 %	Plage logTP <sub>50</sub> -10.2/-8.6 (log[M])
	Plage logTP <sub>10</sub> -10.92/-10.41 (log[M])		Plage logTP <sub>10</sub> -12.3/-9.8 (log[M])
	Courbe sigmoïde		
	CV < 20 % dans les puits tripliqués		

# OECD/OCDE

458

Nom de la méthode d'essai	AR-EcoScreen™	AR-CALUX®	22Rv1/MMTV_GR-KO
Témoin négatif	Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP)	Corticostérone	Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP)
Critères	TP <sub>10</sub> ne peut pas être calculée.	IR < 10 %	TP <sub>10</sub> ne peut pas être calculée.
Contrôle de la spécificité (agoniste)		s.o.	s.o.
Critères	Confirmation par l'ajout d'un puissant antagoniste de l'AR (1 µM d'HF) pour clarifier l'induction de la luciférase non médiée par l'AR.		

Tableau B.2b. Étalons de référence et critères d'acceptabilité des trois méthodes d'essai pour les propriétés ANTAGONISTES

Nom de la méthode d'essai	AR-EcoScreen™	AR-CALUX®	22Rv1/MMTV_GR-KO
<b>ANTAGONISTE</b>			
Produit chimique de référence	Hydroxyflutamide (HF)	Flutamide (FLU)	Bicalutamide
Critères	Plage logCl <sub>50</sub> -7.80/-6.17 (log[M])	Plage Cl <sub>50</sub> 1.0 x 10 <sup>-7</sup> /1.0 x 10 <sup>-6</sup> M	Plage logCl <sub>50</sub> -7.0/-5.8 (log[M])
	Plage logCl <sub>30</sub> -8.37/-6.41 (log[M])		Plage logCl <sub>30</sub> -7.5/-6.2 (log[M])
	ATR TP <sub>ATG</sub> < 46 % (TP <sub>ATG</sub> : 500 pM DHT + 1 µM HF)	Flnh FLU 3.10 <sup>-5</sup> M > 10	ATR TP <sub>ATG</sub> ≤ 53.6 % (TP <sub>ATG</sub> : 800 pM DHT + 1 µM bicalutamide)
	Courbe sigmoïde	Courbe sigmoïde	Courbe sigmoïde
	CV < 20 % dans les puits tripliqués	CV  logCl <sub>50</sub> < 3 %	
		FZ > 0.5	
Témoin positif	Bisphénol A	Linuron	Bisphénol A
Critères	Plage logCl <sub>50</sub> -7.05/-4.29 (log[M])	IR < 60 %	Plage logCl <sub>50</sub> -6.2/-5.0 (log[M])

# OECD/OCDE

458

Nom de la méthode d'essai	AR-EcoScreen™	AR-CALUX®	22Rv1/MMTV_GR-KO
	Plage logCl <sub>30</sub> -7.52/-4.48 (log[M])		Plage logCl <sub>30</sub> -6.6/-5.4 (log[M])
	CV < 20 % dans les puits tripliqués		
Témoin négatif	DEHP	Lévonorgestrel	DEHP
Critères	Cl <sub>30</sub> ne peut pas être calculée.	IR > 85 %	Cl <sub>30</sub> ne peut pas être calculée.
Autre témoin	FI AG <sub>ref</sub> > 5 (AG <sub>ref</sub> : 500 pM DHT)	s.o.	FI AG <sub>ref</sub> ≥ 10 (AG <sub>ref</sub> : 800 pM DHT)
Contrôle de la spécificité (antagoniste)		DHT	DHT
Critères	s.o.	R <sup>2</sup> du produit chimique d'essai ≤ 0.9	R <sup>2</sup> du produit chimique d'essai < 0.9
		R <sup>2</sup> du FLU ≤ 0.7	

s.o. : sans objet

Note : 1) Les trois méthodes d'essai utilisent des techniques mathématiques différentes pour calculer Cl<sub>50</sub> et Cl<sub>30</sub> (interpolation pour la méthode d'essai AR-EcoScreen™ et la méthode d'essai 22Rv1/MMTV\_GR-KO ; ajustement de la courbe pour la méthode d'essai AR-CALUX®) ; 2) Des concentrations de DHT différentes ont été utilisées dans l'essai antagoniste : 500 pM avec la méthode d'essai AR-EcoScreen™ ; 300 pM avec la méthode d'essai AR-CALUX® ; 800 pM avec la méthode d'essai 22Rv1/MMTV\_GR-KO.



**Tableau B.3a. Résultats des trois méthodes d'essai (les produits chimiques ont été soumis à deux ou trois d'entre elles) pour les propriétés AGONISTES**

Nom chimique	N° CAS	Résultat escompté <sup>1</sup>		AR-EcoScreen™			AR-CALUX®			22Rv1/MMTV_GR-KO			Classe chimique <sup>5</sup>	Classe de produit <sup>6</sup>
		Réf. (2003)	Réf. (2017) (2017)	Validation du résultat <sup>2</sup>	logTP <sub>10</sub> <sup>2</sup> (M)	logTP <sub>50</sub> <sup>2</sup> (M)	Validation du résultat <sup>3</sup>	logTP <sub>10</sub> <sup>3</sup> (M)	logCE <sub>50</sub> <sup>3</sup> (M)	Validation du résultat <sup>3</sup>	logTP <sub>10</sub> <sup>4</sup> (M)	logTP <sub>50</sub> <sup>4</sup> (M)		
5α-dihydrotestostérone (DHT)	521-18-6	P	P	P	-12.08/-9.87	-11.03/-9.00	P	-10.64/-10.14	-9.98/-9.42	P	-10.60/-9.83	-9.73/-8.95	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Mestanolone (Méthylidihydrotestostérone)	521-11-9	P		P	-10.92/-10.41	-10.15/-9.26	P	-10.26/-9.99	-9.53/-9.39	P	-10.36/-9.66	-9.65/-8.39	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Testostérone	58-22-0	P	P	P	-10.42/-9.73	-9.46/-8.96	P	-9.81/-9.60	-9.25/-8.80	P	-10.28/-9.91	-9.67/-8.66	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
17β-oestradiol	50-28-2	P		P	-7.74/-6.75	-5.34/-4.88	P	-6.70/-5.85	-	P	-8.76/-8.49	-7.19/-6.03	Stéroïde, phénolique	Produit pharmaceutique
Acétate de médroxyprogestérone	71-58-9	P	P	P	-9.64/-8.89	-8.77/-8.37	P	-9.91/-8.32	-9.23/-7.75	P	-8.77/-8.20	-7.64/-6.01	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
17α-éthinyloestradiol	57-63-6	N		N	-	-	N	-	-	P	-6.21/-5.27	-	Stéroïde, phénolique	Produit pharmaceutique
Phtalate de butyle et de benzyle	85-68-7	N	N	N	-	-	N	-	-	N	-	-	Phtalate	Plastifiant
Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP)	117-81-7	N		N	-	-	N	-	-	N	-	-	Phtalate	Intermédiaire chimique ; plastifiant
Hydroxyflutamide (HF)	52806-53-8	N		N	-	-	N	-	-	P	-5.54/-5.04	-	Anilide	Métabolite pharmaceutique
Bisphénol A	80-05-7	N		N	-	-	N	-	-	N	-	-	Bisphénol	Intermédiaire chimique
Méthyltestostérone	58-18-4	P	P		NT	NT	P	-9.73/-9.57	-9.11/-8.95	P	-10.39/-9.99	-9.63/-9.28	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Progestérone	57-83-0	P			NT	NT	N			P	-7.13/-6.19	-5.50/-5.01	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Corticostérone	50-22-6	N			NT	NT	N			P	-7.16/-5.47	-	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Lévonorgestrel	797-63-7	P	P		NT	NT	P	-9.42/-9.26	-8.91/-8.61	P	-10.28/-9.73	-9.06/-8.46	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Vinclozoline	50471-44-8	N			NT	NT	N		-	N	-	-	Organochloré	Pesticide
Prochloraze	67747-09-5		N		NT	NT	N		-	N	-	-	Imidazole	Pesticide
Atrazine	1912-24-9	N	N		NT	NT	N		-	N	-	-	Triazine ; amine aromatique	Pesticide
6-propyl-2-thiouracil	51-52-5	N			NT	NT	N		-	N	-	-	Pyrimidines	Produit pharmaceutique
o,p-DDT	789-02-6	N	N		NT	NT	N		-	N	-	-	Organochloré	Pesticide

Bicalutamide	90357-06-5	N			NT	NT	N	-	N	-	Anilide	Produit pharmaceutique
Linuron	330-55-2	P			NT	NT	N	-	N	-	Urée	Pesticide

Tableau B.3b. Résultats des trois méthodes d'essai (les produits chimiques ont été soumis à deux ou trois d'entre elles) pour les propriétés ANTAGONISTES

Nom chimique	N° CAS	Résultat escompté <sup>1</sup>		AR-EcoScreen™			AR-CALUX®			22Rv1/MMTV_GR-KO			Classe chimique <sup>5</sup>	Classe de produit <sup>6</sup>
		Réf. (2003)	Réf. (2017)	Validation du résultat <sup>1</sup>	logCl <sub>30</sub> <sup>2</sup> (M)	logCl <sub>50</sub> <sup>2</sup> (M)	Validation du résultat <sup>3</sup>	logTP <sub>80</sub> <sup>3</sup> (M)	logCl <sub>50</sub> <sup>3</sup> (M)	Validation du résultat <sup>4</sup>	logCl <sub>30</sub> <sup>4</sup> (M)	logCl <sub>50</sub> <sup>4</sup> (M)		
Hydroxyflutamide (HF)	52806-53-8	P	P	P	-8.37/-6.41	-7.80/-6.17	P	-8.63/-8.01	-7.80/-7.54	P	-8.17/-7.45	-7.79/-7.11	Anilide	Métabolite pharmaceutique
Bisphénol A	80-05-7	P	P	P	-7.52/-4.48	-7.05/-4.29	P	-6.75/-6.12	-5.93/-5.81	P	-5.92/-5.56	-5.68/-5.29	Bisphénol	Intermédiaire chimique
Flutamide (FLU)	13311-84-7	P		P	-6.20/-5.69	-5.66/-5.43	P	-7.51/-6.71	-6.60/-6.23	P	-7.11/-6.62	-6.70/-6.26	Anilide	Produit pharmaceutique
Prochloraz	67747-09-5	P	P	P	-5.77/-5.47	-5.44/-5.12	P	-6.42/-6.02	-5.78/-5.59	P	-6.02/-5.30	-5.47/-4.95	Imidazole	Pesticide
Vinclozoline	50471-44-8	P	P	P	-6.83/-6.32	-6.47/-5.85	P	-7.91/-7.00	-7.50/-6.75	P	-7.22/-6.74	-6.94/-6.44	Organochloré	Pesticide
5α-dihydrotestostérone (DHT)	521-18-6	N		N	-	-	N	-	-	N	-	-	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Mestanolone	521-11-9	N		N	-	-	N	-	-	N	-	-	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP)	117-81-7	N		N	-	-	N	-	-	N	-	-	Phtalate	Intermédiaire chimique ; plastifiant
Atrazine	1912-24-9	N	N	N	-	-	N	-	-	N	-	-	Triazine ; amine aromatique	Pesticide
6-propyl-2-thiouracil	51-52-5	N		N	-	-	N	-	-	N	-	-	Pyrimidines	Produit pharmaceutique
17β-œstradiol	50-28-2	P			NT	NT	P	-9.05/-8.04	-8.40/-7.64	P	-7.98/-7.20	-	Stéroïde, phénolique	Produit pharmaceutique
17α-éthinyloestradiol	57-63-6	N			NT	NT	P	-8.42/-7.75	-7.57/-7.26	P	-7.91/-7.29	-7.54/-6.88	Stéroïde, phénolique	Produit pharmaceutique
Phtalate de butyle et de benzyle	85-68-7	N			NT	NT	P	-6.13/-5.46	-5.81/-5.11	P	-5.10/-4.57	-4.86/-4.28	Phtalate	Plastifiant
Progestérone	57-83-0	P			NT	NT	P	-8.78/-8.57	-8.07/-8.03	P	-7.40/-6.30	-6.88/-5.97	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Corticostérone	50-22-6	N			NT	NT	P	-6.85/-6.77	-6.35/-6.33	P	-6.36/-6.11	-5.91/-5.51	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
o,p-DDT	789-02-6	P	P		NT	NT	P	-7.33/-6.84	-6.36/-6.24	P	-5.82/-5.48	-5.56/-5.21	Organochloré	Pesticide

# OECD/OCDE

# 458

Bicalutamide	90357-06-5	P	P		NT	NT	P	-8.18/-7.19	-7.23/-6.69	P	-6.92/-6.37	-6.39/-6.10	Anilide	Produit pharmaceutique
Linuron	330-55-2	P	P		NT	NT	P	-6.64/-6.38	-5.85/-5.70	P	-5.64/-5.33	-5.33/-5.11	Urée	Pesticide
Acétate de médroxyprogestérone	71-58-9	N			NT	NT	N	-		N	-		Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Lévonorgestrel	797-63-7	N			NT	NT	N	-		N	-		Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique

Abréviations des tableaux B.3a et B.3b : M : molaire, P : positif, N : négatif, NT : non testé

<sup>1</sup>Résultat escompté : Classements rapportés par l'évaluation de l'ICCVAM de 2003 (5) et la liste de référence de l'ICCVAM relative à l'AR de 2017 (12). La référence de 2017 comprenait des critères supplémentaires pour la confirmation indépendante de l'activité des produits chimiques de référence dans au moins deux essais (résultat positif) ou de l'absence d'activité dans au moins deux essais et de l'absence d'activité positive (résultat négatif). Ainsi, certains produits chimiques figurant dans la référence de 2003, pour lesquels on ne disposait pas de données suffisantes pour satisfaire à ces critères, ont été exclus de la référence ultérieure.

<sup>2</sup>Rapport de validation de la méthode AR-EcoScreen™ (valeurs minimales/maximales de toutes les épreuves valides menées par tous les laboratoires participants).

<sup>3</sup>Rapport de validation de la méthode AR-CALUX® (valeurs minimales/maximales de toutes les épreuves valides menées par tous les laboratoires participants).

<sup>4</sup>Rapport de validation de la méthode 22Rv1/MMTV\_GR-KO (valeurs minimales/maximales de toutes les épreuves valides menées par tous les laboratoires participants).

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

<sup>6</sup>Les produits chimiques ont été placés dans une ou plusieurs classe(s) de produit selon la base de données *Hazardous Substances Database* de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse : <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

Tableau B.4a. Liste des produits chimiques d'épreuve de compétence permettant de démontrer la compétence technique avec chacune des trois méthodes de la présente LD (essai AGONISTE)

Nom chimique	N° CAS	Liste de réf. <sup>1</sup>	AR-EcoScreen™			AR-CALUX®			22Rv1/MMTV_GR-KO			Classe chimique <sup>5</sup>	Classe de produit <sup>6</sup>
			Classe <sup>2</sup>	logTP <sub>10</sub> <sup>2</sup> (M)	logTP <sub>50</sub> <sup>2</sup> (M)	Classe <sup>3</sup>	logTP <sub>10</sub> <sup>3</sup> (M)	logCE <sub>50</sub> <sup>3</sup> (M)	Classe <sup>4</sup>	logTP <sub>10</sub> <sup>4</sup> (M)	logTP <sub>50</sub> <sup>4</sup> (M)		
5α-dihydrotestostérone (DHT)	521-18-6	P	P	-12.08/ -9.87	-11.03/ -9.00	P	-10.64/ -10.14	-9.98/ -9.42	P	-10.60/ -9.83	-9.73/ -8.95	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Mestanolone (Méthyldihydrotestostérone)	521-11-9		P	-10.92/ -10.41	-10.15/ -9.26	P	-10.26/ -9.99	-9.53/ -9.39	P	-10.36/ -9.66	-9.65/ -8.39	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Testostérone	58-22-0	P	P	-10.42/ -9.73	-9.46/ -8.96	P	-9.81/ -9.60	-9.25/ -8.80	P	-10.28/ -9.91	-9.67/ -8.66	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
17β-œstradiol	50-28-2		P	-7.74/ -6.75	-5.34/ -4.88	P	-6.70/ -5.85	-	P	-8.76/ -8.49	-7.19/ -6.03	Stéroïde, phénolique	Produit pharmaceutique
Acétate de médroxyprogestérone	71-58-9	P	P	-9.64/ -8.89	-8.77/ -8.37	P	-9.91/ -8.32	-9.23/ -7.75	P	-8.77/ -8.20	-7.64/ -6.01	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
Phtalate de butyle et de benzyle	85-68-7	N	N	-	-	N	-	-	N	-	-	Phtalate	Plastifiant
Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP)	117-81-7		N	-	-		-	-	N	-	-	Phtalate	Intermédiaire chimique ; plastifiant
Bisphénol A	80-05-7		N	-	-	N	-	-	N	-	-	Bisphénol	Intermédiaire chimique

Abréviations : M : molaire, P : positif, N : négatif

<sup>1</sup>liste de référence de l'ICCVAM relative à l'AR (2017) (12).

<sup>2</sup>Rapport de validation de la méthode AR-EcoScreen™ (valeurs minimales/maximales de toutes les épreuves valides menées par tous les laboratoires participants).

<sup>3</sup>Rapport de validation de la méthode AR-CALUX® (valeurs minimales/maximales de toutes les épreuves valides menées par tous les laboratoires participants).

<sup>4</sup>Rapport de validation de la méthode 22Rv1/MMTV\_GR-KO (valeurs minimales/maximales de toutes les épreuves valides menées par tous les laboratoires participants).

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

<sup>6</sup>Les produits chimiques ont été placés dans une ou plusieurs classe(s) de produit selon la base de données *Hazardous Substances Database* de la Bibliothèque

nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse : <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

**Tableau B.4b. Liste des produits chimiques d'épreuve de compétence permettant de démontrer la compétence technique avec chacune des trois méthodes de la présente LD (essai ANTAGONISTE)**

Nom chimique	N° CAS	Liste de réf. <sup>1</sup>	AR-EcoScreen™			AR-CALUX®			22Rv1/MMTV_GR-KO			Classe chimique <sup>5</sup>	Classe de produit <sup>6</sup>
			Classe <sup>2</sup>	logCIP <sub>30</sub> <sup>2</sup> (M)	logCI <sub>50</sub> <sup>2</sup> (M)	Classe <sup>3</sup>	logTP <sub>80</sub> <sup>3</sup> (M)	logCI <sub>50</sub> <sup>3</sup> (M)	Classe <sup>4</sup>	logCI <sub>30</sub> <sup>4</sup> (M)	logCI <sub>50</sub> <sup>4</sup> (M)		
Hydroxyflutamide (HF)	52806-53-8		P	-8.37/-6.41	-7.80/-6.17	P	-8.63/-8.01	-7.80/-7.54	P	-8.17/-7.45	-7.79/-7.11	Anilide	Métabolite pharmaceutique
Bisphénol A	80-05-7		P	-7.52/-4.48	-7.05/-4.29	P	-6.75/-6.12	-5.93/-5.81	P	-5.92/-5.56	-5.68/-5.29	Bisphénol	Intermédiaire chimique
Flutamide (FLU)	13311-84-7		P	-6.20/-5.69	-5.66/-5.43	P	-7.51/-6.71	-6.60/-6.23	P	-7.11/-6.62	-6.70/-6.26	Anilide	Produit pharmaceutique
Prochloraze	67747-09-5		P	-5.77/-5.47	-5.44/-5.12	P	-6.42/-6.02	-5.78/-5.59	P	-6.02/-5.30	-5.47/-4.95	Imidazole	Pesticide
Vinclozoline	50471-44-8		P	-6.83/-6.32	-6.47/-5.85	P	-7.91/-7.00	-7.50/-6.75	P	-7.22/-6.74	-6.94/-6.44	Organochloré	Pesticide
Mestanolone	521-11-9		N	-	-	N	-	-	N	-	-	Stéroïde, non phénolique	Produit pharmaceutique
phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP)	117-81-7		N	-	-	N	-	-	N	-	-	Phtalate	Intermédiaire chimique ; plastifiant
Atrazine	1912-24-9		N	-	-	N	-	-	N	-	-	Triazine ; amine aromatique	Pesticide
6-propyl-2-thiouracil	51-52-5		N	-	-	N	-	-	N	-	-	Pyrimidines	Produit pharmaceutique

**Tableau B.4c. Liste de deux produits chimiques d'épreuve de compétence visant à contrôler la spécificité de l'antagoniste (pour la méthode AR-CALUX® uniquement)**

			AR-CALUX®			
Nom chimique	N° CAS	Liste de réf. <sup>1</sup>	Classe <sup>3</sup>	Observation effectuée dans le cadre du contrôle de la spécificité mené avec une concentration plus faible et plus forte du ligand DHT	Classe chimique <sup>5</sup>	Classe de produit <sup>6</sup>
Kétoconazole	65277-42-1		N	Deux doses-réponses avec un décalage, $R^2 \leq 0.9$	Pipérazine	Produit pharmaceutique, antifongique
Cycloheximide	66-81-9		N	Deux doses-réponses avec un décalage, $R^2 \leq 0.9$	dérivé de la pipéridine	Produit pharmaceutique, fongicide

Abréviations des tableaux B.4b et B.4c : M : molaire, P : positif, N : négatif

<sup>1</sup>liste de référence de l'ICCVAM relative à l'AR (2017) (12).

<sup>2</sup>Rapport de validation de la méthode AR-EcoScreen™ (valeurs minimales/maximales de toutes les épreuves valides menées par tous les laboratoires participants).

<sup>3</sup>Rapport de validation de la méthode AR-CALUX® (valeurs minimales/maximales de toutes les épreuves valides menées par tous les laboratoires participants).

<sup>4</sup>Rapport de validation de la méthode 22Rv1/MMTV\_GR-KO (valeurs minimales/maximales de toutes les épreuves valides menées par tous les laboratoires participants).

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

<sup>6</sup>Les produits chimiques ont été placés dans une ou plusieurs classe(s) de produit selon la base de données *Hazardous Substances Database* de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis (disponible à l'adresse : <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

## Rapport d'essai

1. Il convient d'utiliser le modèle ci-dessous avec les trois méthodes d'essai. La section consacrée aux résultats est propre à chaque méthode d'essai.
2. Le rapport d'essai comporte les informations suivantes :

### **Informations d'ordre général :**

- Nom et adresse du donneur d'ordre, de l'installation d'essai et du directeur de l'étude ;
- Référence à la LD n° 458 et à la méthode d'essai ;
- Référence à la méthode de solubilité.

### **Démonstration des compétences :**

- Déclaration indiquant que le laboratoire, avant d'appliquer la méthode d'essai en routine, a démontré sa compétence à la mettre en œuvre en testant les produits chimiques d'épreuve de compétence.

### **Étalons de référence (produit chimique de référence, témoins positif et négatif) et produit chimique d'essai :**

- Source, numéro de lot, date d'expiration, numéro CAS, si possible ;
- Pureté et identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent ;
- Apparence physique, hydrosolubilité, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
- Traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, par exemple) ;
- Conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
- Choix du solvant/véhicule pour chaque produit chimique d'essai et justification.

### **Substances chimiques monoconstituants :**

Identification chimique, telle que désignation IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale et/ou autres identifiants, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent.

### **Substances chimiques multiconstituants, UVCB et mélanges :**

Caractérisation, dans la mesure du possible, par l'identité chimique (voir ci-dessus), les caractéristiques quantitatives et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants, selon les données disponibles.

### **Solvant/véhicule**

Exemples : DMSO, eau, éthanol

- Source, numéro de lot ;
- Justification du choix du solvant/véhicule.

### **Conditions de la méthode d'essai :**

- Lignée cellulaire utilisée, source, conditions de stockage et de maintien, nombre de passages et niveau de confluence des cellules utilisées pour 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), en particulier réglages de l'instrument. Substrat de luciférase utilisé (nom du produit, fournisseur, lot) ;
- Type de plaques, fournisseur et code ;
- Procédure d'application et durée d'exposition telles que mentionnées dans le protocole ;
- Liste des critères d'acceptabilité à remplir ;
- Description de toute modification de la procédure d'essai ;
- Référence à la procédure en matière de cytotoxicité.

**Résultats obtenus avec la méthode d'essai AR-EcoScreen™ :**

**Présentation tabulaire des résultats suivants pour les étalons de référence :**

- Pour tous les étalons de référence : données normalisées des signaux luminescents ; résultats de l'application des critères d'acceptabilité ;
- Mesure de l'erreur (ET, % CV ou intervalle de confiance à 95 %, par exemple).

**Présentation tabulaire des résultats suivants pour les produits chimiques d'essai :**

- Solubilité et stabilité, si elles sont connues ;
- Mesure de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant ;
- Pour chaque épreuve :
  - Données relatives à la cytotoxicité ;
  - Concentrations d'essai ;
  - Données normalisées des signaux luminescents et une mesure de l'erreur (ET, % CV ou intervalle de confiance à 95 %, par exemple) ;
  - Essai agoniste :  $TP_{max}$ ,  $\log TP_{10}$ ,  $\log TP_{50}$ ,  $CE_{50}$ , le cas échéant, coefficient multiplicateur d'induction maximal ;
  - Essai antagoniste :  $\log CI_{30}$ ,  $\log CI_{50}$ , coefficient multiplicateur d'inhibition maximal ;
  - Le résultat (positif ou négatif) par produit chimique après application des critères de décision ;
  - La conclusion (positive ou négative) par produit chimique (d'après le résultat de deux ou trois épreuves).
- Nombre d'épreuves réalisées ;
- Graphiques illustrant la relation concentration-réponse des produits chimiques de référence et des produits chimiques d'essai ;
- Description de toute autre observation pertinente.

**Résultats obtenus avec la méthode d'essai AR-CALUX® :**

**Présentation tabulaire des résultats suivants pour les étalons de référence :**

- Pour tous les étalons de référence : données normalisées des signaux luminescents ; résultats de l'application des critères d'acceptabilité ;
- En outre, pour les produits chimiques de référence :  $CE_{10}$  et  $CE_{50}$  pour la DHT,  $CI_{20}$  et  $CI_{50}$  pour le flutamide ;
- Mesure de l'erreur (CV, par exemple).

**Présentation tabulaire des résultats suivants pour les produits chimiques d'essai :**

- Solubilité et stabilité, si elles sont connues ;
- Mesure de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant ;

- Pour l'épreuve préliminaire :
  - Données relatives à la cytotoxicité (perte de LDH et observations au microscope) ;
  - Concentrations d'essai ;
  - Données normalisées des signaux luminescents et une mesure de l'erreur (ET, % CV ou intervalle de confiance à 95 %, par exemple) ;
- Pour l'épreuve complète :
  - Données relatives à la cytotoxicité (observations au microscope) ;
  - Concentrations d'essai, y compris facteurs de dilution ;
  - Données normalisées des signaux luminescents et une mesure de l'erreur (ET, % CV ou intervalle de confiance à 95 %, par exemple) ;
  - Essai agoniste :  $RTP_{max}$ ,  $TP_{max}$ ,  $CE_{10}$ ,  $CE_{50}$ ,  $TP_{10}$ ,  $TP_{50}$ , |CV| de  $\log CE_{50}$ , le cas échéant ;
  - Essai antagoniste :  $RTP_{min}$ ,  $TP_{min}$ ,  $CI_{20}$ ,  $CI_{50}$ ,  $TP_{80}$ ,  $TP_{50}$ , |CV| de  $\log CI_{50}$ , le cas échéant ;
  - Contrôle de la spécificité :  $R^2$  ;
  - Le résultat (positif ou négatif) par produit chimique après application des critères de décision (sur la base d'une épreuve complète).
- Graphiques illustrant la relation concentration-réponse des produits chimiques de référence et des produits chimiques d'essai ; y compris graphiques relatifs au contrôle de la spécificité ;
- Description de toute autre observation pertinente.

#### ***Résultats obtenus avec la méthode d'essai 22Rv1/MMTV\_GR-KO :***

##### ***Présentation tabulaire des résultats suivants pour les étalons de référence :***

- Pour tous les étalons de référence : données normalisées des signaux luminescents ; résultats de l'application des critères d'acceptabilité ;
- Mesure de l'erreur (ET, % CV ou intervalle de confiance à 95 %, par exemple).

##### ***Présentation tabulaire des résultats suivants pour les produits chimiques d'essai :***

- Solubilité et stabilité, si elles sont connues ;
- Mesure de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant ;
- Pour chaque épreuve préliminaire et chaque épreuve complète :
  - Données relatives à la cytotoxicité ;
  - Concentrations d'essai, y compris facteurs de dilution ;
  - Données normalisées des signaux luminescents et une mesure de l'erreur (CV, par exemple) ;
  - Essai agoniste :  $\log TP_{10}$ ,  $\log TP_{50}$ , coefficient multiplicateur d'induction maximal ;
  - Essai antagoniste :  $\log CI_{30}$ ,  $\log CI_{50}$ , coefficient multiplicateur d'inhibition maximal ;
  - Contrôle de la spécificité :  $R^2$
  - Le résultat (positif ou négatif) par produit chimique après application des critères de décision.
  - La conclusion (positive ou négative) par produit chimique (d'après le résultat soit de deux ou trois épreuves préliminaires soit de deux ou trois épreuves complètes).
  - Nombre d'épreuves réalisées (épreuves préliminaires et complètes) ;
  - Graphiques illustrant la relation concentration-réponse des produits chimiques de référence et des produits chimiques d'essai ; y compris graphiques relatifs au contrôle de la spécificité ;
  - Description de toute autre observation pertinente.

*Discussion des résultats*

*Conclusion*

## Annex C. (méthode 1) Essai de transactivation médiée par les récepteurs des androgènes visant la détection de l'activité androgénique agoniste et antagoniste des produits chimiques et utilisant la lignée cellulaire avec AR humain AR-EcoScreen™ obtenue par transfection stable

### Remarques préliminaires et limites

1. Il convient de lire la section « Introduction générale » avant d'utiliser cette méthode d'essai (corps du texte, pages 6-9).
2. La méthode AR-EcoScreen™ utilise la lignée cellulaire AR-EcoScreen™ pour détecter l'activité (anti-)androgénique. Cette méthode porte exclusivement sur l'activation et l'inhibition transcriptionnelles d'un gène rapporteur régulé par les androgènes par liaison à l'AR humain, aussi ne convient-il pas de l'extrapoler directement aux mécanismes *in vivo* complexes de régulation androgénique qui caractérisent les processus cellulaires. De plus, cet essai n'est susceptible de donner des informations que sur l'activité de la molécule parente, du fait des capacités métaboliques limitées du système cellulaire *in vitro*.
3. Cette méthode d'essai est conçue spécifiquement pour détecter l'activation et l'inhibition transcriptionnelles médiées par l'AR humain, avec l'activité de la luciférase comme effet mesuré. Une conception d'essai high-throughput peut être obtenue en utilisant les valeurs des CP et un format à doses fixes. Cependant, on a connaissance de cas d'interférence de produits chimiques avec les signaux de luminescence sous l'effet de la suractivation ou de la surinhibition du gène rapporteur luciférase (1) (2) (3). Une telle interférence avec le gène rapporteur luciférase pourrait donc se produire dans les systèmes d'essai AR-EcoScreen™ utilisant la luciférase. Cet élément doit être pris en compte lors de l'évaluation des données.
4. Cette lignée cellulaire a été développée en vue de l'obtention d'une réponse médiée par le récepteur des glucocorticoïdes (GR) aussi faible que possible ; l'interférence avec ce récepteur pourrait néanmoins limiter la sélectivité pour le récepteur des androgènes (4) (5). Il se peut donc que, dans certains cas, les produits chimiques qui activent le GR se retrouvent classés positifs avec cette méthode d'essai. Lorsque des recherches plus poussées sont jugées nécessaires, il est possible de tester à la fois les signaux utilisant la luciférase non médiés par le récepteur et l'activation du GR en incubant le produit chimique d'essai avec un antagoniste de l'AR (hydroxyflutamide (HF), par exemple) afin de déterminer si, oui ou non, la réponse induite par le produit chimique d'essai est bloquée (voir l'annexe 1).
5. Cette méthode d'essai ayant été validée au moyen de substances monoconstituants, il n'existe aucune information quant à son applicabilité aux mélanges. Cela étant, elle demeure théoriquement applicable à l'évaluation de mélanges ou de substances multiconstituants. Avant d'appliquer la présente Ligne directrice à un mélange en vue de générer des données à des fins réglementaires, il convient d'examiner si et, dans l'affirmative, pourquoi cet essai peut fournir des résultats appropriés. Cette vérification n'est pas nécessaire lorsque la réglementation exige de tester le mélange.

6. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont fournies à l'annexe A de la présente LD.

7. La méthode d'essai AR-EcoScreen™ a été validée en collaboration avec l'Institut d'évaluation et de recherche sur les produits chimiques (*Chemicals Evaluation and Research Institute – CERI, Japon*) et l'Institut national des sciences de la santé (*National Institute of Health Sciences – NIHS, Japon*), avec l'aide de l'équipe de gestion d'étude du groupe de l'OCDE chargé de la gestion de la validation des essais n'ayant pas recours à des animaux (6).

8. La version précédente (2016) de la LD n° 458 indiquait, pour l'essai antagoniste de la méthode d'essai AR EcoScreen™, un dosage de 0.1 µM d'HF. Le dosage est désormais de 1.0 µM d'HF (voir le tableau B.2b) pour augmenter la sensibilité de l'essai et s'aligner sur les concentrations utilisées lors de la validation de l'essai antagoniste. Les résultats des études antérieures réalisées avec 0.1 µM d'HF sont fiables si les critères de performance ont été respectés.

### Principe de la méthode d'essai

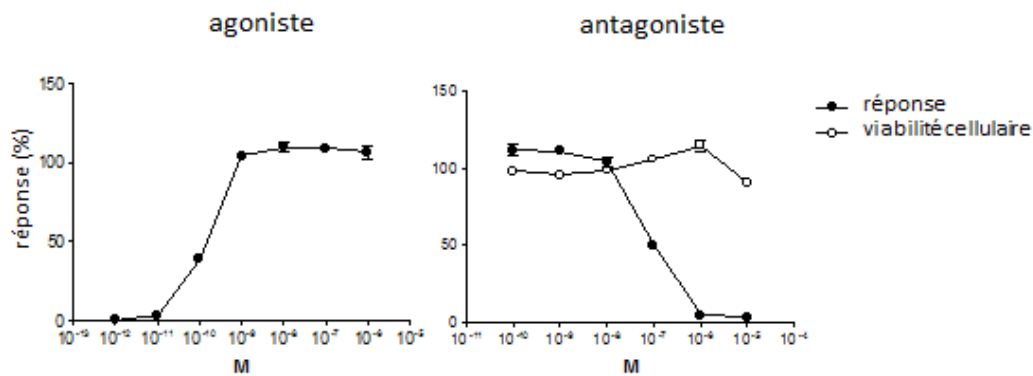
9. Cette méthode d'essai fondée sur une technique utilisant un gène rapporteur est un outil *in vitro* qui fournit des données mécanistiques. Elle est utilisée pour déterminer l'activation ou le blocage du signal du récepteur des androgènes sous l'action d'un ligand. Une fois la liaison établie, le complexe récepteur-ligand subit une translocation vers le noyau où il se fixe à certains éléments de réponse de l'ADN et transactive le gène rapporteur luciférase de luciole, induisant une augmentation de l'expression cellulaire de l'enzyme luciférase. La luciférine est un substrat transformé par l'enzyme luciférase en produit bioluminescent mesurable quantitativement par un luminomètre. Ainsi, l'activité de la luciférase peut être évaluée rapidement et à faible coût à l'aide de l'un des nombreux kits d'essai disponibles dans le commerce.

10. Le système d'essai proposé dans cette Annexe utilise la lignée cellulaire AR-EcoScreen™, issue d'une lignée cellulaire d'ovaire de hamster chinois (CHO-K1) et comprenant trois chimères transfectées de façon stable, à commencer par (i) la chimère d'expression de l'AR humain (encodant la totalité du gène rapporteur humain identique au numéro M20132 de la base de données Genbank portant 21 séquences répétées en tandem du trinucleotide CAG), et (ii) une chimère du gène rapporteur luciférase de luciole portant quatre séquences répétées en tandem d'un élément de réponse au gène C3 de la prostate et régée par un élément promoteur minimal de la protéine du stress. L'élément de réponse androgénique dérivé du gène C3 est sélectionné pour inhiber au maximum les réponses médiées par le GR. De plus, (iii) pour l'évaluation de la viabilité cellulaire, une chimère du gène rapporteur luciférase de Renilla, sous le contrôle du promoteur SV40, présentant une expression stable et non inductible, est transfectée, l'objectif étant de faire la distinction entre un effet antagoniste pur et une baisse de l'activité de la luciférase due à la cytotoxicité. Les deux activités enzymatiques peuvent être mesurées simultanément dans la même cellule et dans le même puits. Cela facilite la détection de l'antagoniste (7) (8). La lignée cellulaire AR-EcoScreen GR KO M1(JCRB1761), modifiée avec l'inactivation du GR par édition du génome et non encore officiellement validée, peut être obtenue auprès de la banque cellulaire JCRB pour une enquête plus rigoureuse sur l'effet antagoniste médié par l'AR (9).

11. L'interprétation des données en ce qui concerne l'**effet agoniste de l'AR** dépend de la réponse maximale provoquée par le produit chimique d'essai. Si cette réponse est supérieure ou égale à 10 % de celle provoquée par 10 nM de 5α-dihydrotestostérone (DHT), le témoin agoniste (TP<sub>AGO</sub>) (à savoir le logTP<sub>10</sub>), le produit chimique d'essai est considéré comme positif. L'interprétation des données en ce qui concerne l'**effet antagoniste de l'AR** dépend d'une valeur limite correspondant à une inhibition de 30 % de la réponse obtenue avec 500 pM de DHT (à savoir le logCI<sub>30</sub>). Si la réponse dépasse ces 30 % de

blocage de l'AR, le produit chimique est considéré comme un antagoniste positif de l'AR. L'analyse et l'interprétation des données sont développées plus en détail aux paragraphes 48-60. Le graphique C.1 illustre les courbes types des agonistes et antagonistes de référence (DHT et HF).

Graphique C.1. Réponses types des témoins positifs



## Démonstration des compétences du laboratoire

12. Avant de tester avec la méthode d'essai AR EcoScreen™ des produits chimiques dont l'activité est inconnue, chaque laboratoire doit confirmer la réactivité du système d'essai pour l'obtention des résultats escomptés, au moins à chaque fois qu'un nouveau lot de cellules mères issues du stock congelé est préparé. Pour ce faire, chaque laboratoire teste de manière indépendante les produits chimiques d'épreuve de compétence figurant dans le tableau B.4a (activité agoniste) et le tableau B.4b (activité antagoniste) de l'annexe B de la présente LD. Les produits chimiques en question sont testés au moins deux fois, à des jours différents, et les résultats doivent concorder avec les classements et les valeurs des tableaux B.4a et B.4b de l'annexe B ; tout écart doit être justifié. Chaque produit chimique d'épreuve de compétence est classé dans le tableau B.2a et le tableau B.2b selon son activité prédominante connue, laquelle est utilisée pour l'évaluation des compétences.

## Procédure

### Lignées cellulaires

13. Cette méthode d'essai fait appel à la lignée cellulaire AR-EcoScreen™ obtenue par transfection stable. Cette lignée peut être obtenue auprès de la banque cellulaire JCRB (*Japanese Collection of Research Bioresources*) sous la référence n° JCRB1328, après signature d'un accord de transfert de matériel (MTA) incluant un contrat de licence.

14. Il convient de n'utiliser que des cultures de cellules exemptes de mycoplasmes. Pour détecter une infection mycoplasmaïque avec le bon niveau de sensibilité, il est recommandé d'appliquer une méthode de type RCP (10) (11) (12).

### *Stabilité de la lignée cellulaire*

15. Les étalons de référence utilisés pour vérifier la stabilité de la lignée cellulaire dans le cadre de l'**essai agoniste** sont la 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone (DHT), la mestanolone et le phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP). Pour chacun de ces trois étalons de référence, il convient de relever la courbe concentration-réponse complète au moins une fois au cours de l'essai sur l'ensemble de la plage de concentrations d'essai présentée dans le tableau C.1b et conformément à la répartition des concentrations dans la plaque d'essai présentée dans le tableau C.2a, et les résultats doivent concorder avec ceux des tableaux C.1a et C.1b.

16. Les étalons de référence utilisés pour vérifier la stabilité de la lignée cellulaire dans le cadre de l'**essai antagoniste de l'AR** sont l'hydroxyflutamide (HF), le bisphénol A (BPA) et le phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP). Pour chacun de ces trois étalons de référence, il convient de relever la courbe concentration-réponse complète au moins une fois au cours de l'essai sur l'ensemble de la plage de concentrations d'essai présentée dans le tableau C.1d et conformément à la répartition des concentrations dans la plaque d'essai présentée dans le tableau C.2b, et les résultats doivent concorder avec ceux des tableaux C.1c et C.1d.

### *Conditions de dépôt et de culture des cellules*

17. Les milieux suivants sont préparés :

- Milieu de dilution : DMEM/F12 sans rouge de phénol.
- Milieu de propagation cellulaire : DMEM/F12 sans rouge de phénol, additionné de 5 % v/v de sérum de veau fœtal (SVF), de zéocine (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), d'hygromycine (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), de pénicilline (100 unités/mL) et de streptomycine (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).
- Milieu de la plaque d'essai : DMEM/F12 sans rouge de phénol, additionné de 5 % v/v de sérum de veau fœtal traité au charbon enrobé de dextrane (DCC-FBS), de pénicilline (100 unités/mL) et de streptomycine (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

18. Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 5 % de CO<sub>2</sub> à 37°  $\pm$  1° C avec le milieu de propagation cellulaire. Lorsqu'elles atteignent une confluence de 75-90 % (c'est-à-dire tous les 3-4 jours), elles sont divisées en sous-cultures de 10 mL contenant 0.4-0.8  $\times$  10<sup>5</sup> cellules/mL dans des boîtes pour cultures cellulaires de 100 mm de diamètre. Pour la préparation de la plaque d'essai (plaque 96 puits), les cellules sont mises en suspension dans le milieu d'essai puis déposées dans les puits d'une plaque microtitre contenant 90  $\mu\text{L}$ /puits à une densité de 1.0  $\times$  10<sup>5</sup> cellules/mL. Les cellules sont ensuite pré-incubées dans un incubateur à 5 % de CO<sub>2</sub> à 37°  $\pm$  1° C pendant les 24 heures qui précèdent l'exposition au produit chimique.

19. Afin de maintenir l'intégrité de la réponse, les cellules cultivées font l'objet de plus d'un passage du stock congelé au milieu conditionné pour la propagation cellulaire, le nombre de passages ne devant pas dépasser 40. Dans des conditions de culture adaptées, la lignée cellulaire AR-EcoScreen™ est stable pendant au maximum trois mois.

20. Le DCC-FBS peut être obtenu de sources commerciales. La performance de l'essai dépend de façon critique du DCC-FBS utilisé ; c'est pourquoi, il convient de sélectionner le DCC-FBS approprié en fonction de sa capacité de prolifération et de la confirmation de son effet sur la performance de l'essai avec les étalons de référence.

**Critères d'acceptabilité**

**Étalons de référence positifs et négatifs**

21. Avant et pendant l'étude, il convient de vérifier la réactivité du système d'essai à l'aide des concentrations appropriées des étalons de référence connus, indiqués dans les tableaux C.1b et C.1d, la DHT et la mestanolone servant d'étalons de référence positifs dans le cadre de l'essai agoniste, l'HF et le BPA d'étalons de référence positifs dans le cadre de l'essai antagoniste, et le DEHP d'étalon de référence négatif dans le cadre des essais agoniste et antagoniste. La fourchette des valeurs acceptables issues de l'étude de validation est présentée dans les tableaux C.1b et C.1c (2). Il convient d'inclure ces trois étalons de référence concomitants des essais (ant)agonistes dans chaque épreuve (ant)agoniste (menée dans les mêmes conditions, notamment avec les mêmes matériels, nombres de passages des cellules, et techniciens) ; les résultats doivent être compris dans les limites acceptables indiquées ; et la courbe concentration-réponse des étalons de référence positifs doit être de forme sigmoïde. Si tel n'est pas le cas, il convient de déterminer la cause de l'écart par rapport aux critères d'acceptabilité (par exemple, manipulation des cellules, qualité du sérum et des antibiotiques, concentration), et de répéter l'essai. Lorsque les critères d'acceptabilité sont satisfaits, il est essentiel de maintenir la cohérence dans l'utilisation des matériels de culture cellulaire pour garantir une variabilité minimale des valeurs logTP<sub>50</sub>, logTP<sub>10</sub>, logCI<sub>30</sub> et logCI<sub>50</sub>.

22. Les critères d'acceptabilité des trois étalons de référence concomitants peuvent garantir l'exactitude de la sensibilité quantitative de l'essai, mais aux fins de l'évaluation qualitative, des écarts par rapport aux fourchettes acceptables pour les étalons de référence (telles que précisées dans les tableaux C.1b et C.1c) peuvent être autorisés si les critères de qualité sont respectés. Toutefois, il convient d'inclure les étalons de référence dans chaque épreuve et d'apprécier les résultats en fonction des paramètres indiqués dans les tableaux C.1b et C.1c, sachant que la courbe concentration-réponse des étalons de référence positifs (produit chimique de référence et témoin positif) doit être de forme sigmoïde.

**Tableau C.1a. Critères de qualité pour l'essai agoniste de l'AR**

FI TP <sub>AGO</sub> (10 nM de DHT)	≥ 6.4
FI TP <sub>10</sub>	Supérieur à 1 + 2ET (FI TV)

FI TP<sub>10</sub> : coefficient multiplicateur d'induction correspondant à TP<sub>10</sub> (10 %) du témoin positif agoniste de l'AR (TP<sub>AGO</sub> : 10 nM de DHT)  
 ET : écart-type, TV : témoin véhicule

Le coefficient multiplicateur d'induction du TP<sub>AGO</sub> se calcule de la façon suivante :

$$FI TP_{AGO} = \frac{\text{Moyenne des URL du TP}_{AGO} (10 \text{ nM de DHT})}{\text{Moyenne des URL du TV}}$$

URL : unités relatives de lumière



Tableau C.1b. Fourchette des valeurs acceptables pour les étalons de référence dans l'essai agoniste de l'AR

Nom du produit chimique [N° CAS]	Évaluation	logTP <sub>10</sub>	logTP <sub>50</sub>	Plage d'essai
5α-dihydrotestostérone (DHT) [521-18-6]	Positif : calculer TP <sub>10</sub>	-12.08 ~ -9.87	-11.03 ~ -9.00	1.0 x 10 <sup>-12</sup> ~ 1.0 x 10 <sup>-6</sup> M
Mestanolone [521-11-9]	Positif : calculer TP <sub>10</sub>	-10.92 ~ -10.41	-10.15 ~ -9.26	1.0 x 10 <sup>-12</sup> ~ 1.0 x 10 <sup>-6</sup> M
Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP) [117-81-7]	Négatif : ne pas calculer TP <sub>10</sub>	-	-	1.0 x 10 <sup>-11</sup> ~ 1.0 x 10 <sup>-5</sup> M

Tableau C.1c. Critères de qualité dans l'essai antagoniste de l'AR

FI AGref	≥ 5.0
ATR du TP <sub>ATG</sub> (%)	≤ 46

AGref : étalon de référence agoniste (500 pM de DHT) dans l'essai antagoniste.

ATR : activité transcriptionnelle relative

TP<sub>ATG</sub>: témoin antagoniste de l'AR (500pM de DHT, 1 µM d'HF)

Le coefficient multiplicateur d'induction de l'AGref se calcule de la façon suivante :

$$FI \text{ AGref} = \frac{\text{Moyenne des URL AGref (500 pM de DHT)}}{\text{Moyenne des URL du TV}}$$

TV : témoin véhicule, URL : unités relatives de lumière

L'ATR (en pourcentage) du TP<sub>ATG</sub> se calcule de la façon suivante :

$$ATR \text{ du TP}_{ATG} = \text{moyenne} \left( \frac{URL \text{ du TP}_{ATG} - \text{Moyenne des URL du TV}}{\text{Moyenne des URL AG}_{ref} - \text{Moyenne des URL du TV}} \right) \times 100$$

**Table C.1d. Fourchette des valeurs acceptables pour les étalons de référence dans le cadre de l'essai antagoniste de l'AR**

Nom chimique [N° CAS]	Évaluation	logCl <sub>30</sub>	logCl <sub>50</sub>	Plage d'essai
Hydroxyflutamide (HF) [52806-53-8]	Positif : calculer Cl <sub>30</sub>	-8.37 ~ -6.41	-7.80 ~ -6.17	1.0 x 10 <sup>-10</sup> ~ 1.0 x 10 <sup>-5</sup> M
Bisphénol A (BPA) [80-05-7]	Positif : calculer Cl <sub>30</sub>	-7.52 ~ -4.48	-7.05 ~ -4.29	1.0 x 10 <sup>-10</sup> ~ 1.0 x 10 <sup>-5</sup> M
Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP) [117-81-7]	Négatif ne pas calculer Cl <sub>30</sub>	-	-	1.0 x 10 <sup>-10</sup> ~ 1.0 x 10 <sup>-5</sup> M

### *Témoin véhicule, témoin positif agoniste et témoin positif antagoniste*

23. **Pour l'essai agoniste**, il convient de préparer sur chaque plaque d'essai, conformément à la configuration indiquée dans les tableaux C.2a et C.3a, des puits (n=4) contenant le témoin positif agoniste (TP<sub>AGO</sub>) ayant reçu un ligand endogène (10 nM de DHT) comme traitement, des puits (n=4) contenant le témoin véhicule (TV) c'est-à-dire ayant reçu le véhicule comme seul traitement, ainsi que des puits (n=4) contenant le témoin de cytotoxicité positif (TP<sub>CT</sub>, 10 µg/mL de cycloheximide).

24. **Pour l'essai antagoniste**, il convient de préparer sur chaque plaque d'essai, conformément à la configuration indiquée dans les tableaux C.2b et C.3b, un témoin véhicule (n=3), un témoin positif agoniste (TP<sub>AGO</sub>, 10 nM de DHT, n=3), un témoin positif antagoniste (TP<sub>ATG</sub>, 500 pM de DHT et 1 µM d'HF, n=3), un témoin de cytotoxicité positif (TP<sub>CT</sub>, 10 µg/mL de cycloheximide, n=3) et un étalon de référence agoniste (AG<sub>ref</sub>, 500 pM de DHT, n=12).

### *Critères de qualité pour l'essai agoniste de l'AR*

25. L'activité moyenne de la luciférase du TP<sub>AGO</sub> (10 nM de DHT) doit être égale à au moins 6.4 fois celle du TV sur chaque plaque de l'essai agoniste. Ce critère a été établi sur la base de la fiabilité des valeurs des paramètres d'évaluation issues de l'étude de validation.

26. En matière de contrôle de la qualité de l'essai, il convient que le coefficient multiplicateur d'induction correspondant au logTP<sub>10</sub> (10 %) du témoin positif agoniste (TP<sub>AGO</sub> : 10 nM de DHT) (FI TP<sub>10</sub>) dépasse de 1+2 ET (écarts-types) la valeur de l'induction (=1) du TV concomitant.

### *Critères de qualité pour l'essai antagoniste de l'AR*

27. L'activité moyenne de la luciférase de l'AG<sub>ref</sub> (500 pM de DHT) doit être égale à au moins 5.0 fois celle du TV sur chaque plaque de l'essai antagoniste. Ce critère a été établi sur la base de la fiabilité des valeurs des paramètres d'évaluation issues de l'étude de validation.

28. L'ATR du TP<sub>ATG</sub> (500 pM de DHT et 1 µM d'HF) doit être inférieure à 46 %.

### *Synthèse*

29. Les critères d'acceptabilité sont les suivants :

Pour l'essai agoniste de l'AR :

- L'activité moyenne de la luciférase du TP<sub>AGO</sub> (10 nM de DHT) est égale ou supérieure à 6.4 fois celle du TV sur chaque plaque.
- Le coefficient multiplicateur d'induction correspondant à la valeur logTP<sub>10</sub> du TP<sub>AGO</sub> simultanément inclus dans l'essai (10 nM de DHT) dépasse de 1+2 ET la valeur de l'induction

du TV concomitant.

- La courbe concentration-réponse des étalons de référence positifs est de forme sigmoïde.
- Les résultats obtenus pour les trois étalons de référence demeurent dans la fourchette acceptable (tableau C.1b).

Pour l'essai antagoniste de l'AR :

- L'activité moyenne de la luciférase de l'AGref (500 pM de DHT) est égale ou supérieure à 5.0 fois celle du TV sur chaque plaque.
- L'ATR du TP<sub>ATG</sub> est inférieure à 46 %.
- La courbe concentration-réponse des étalons de référence positifs est de forme sigmoïde.
- Les résultats obtenus pour les trois étalons de référence demeurent dans la fourchette acceptable (tableau C.1d).

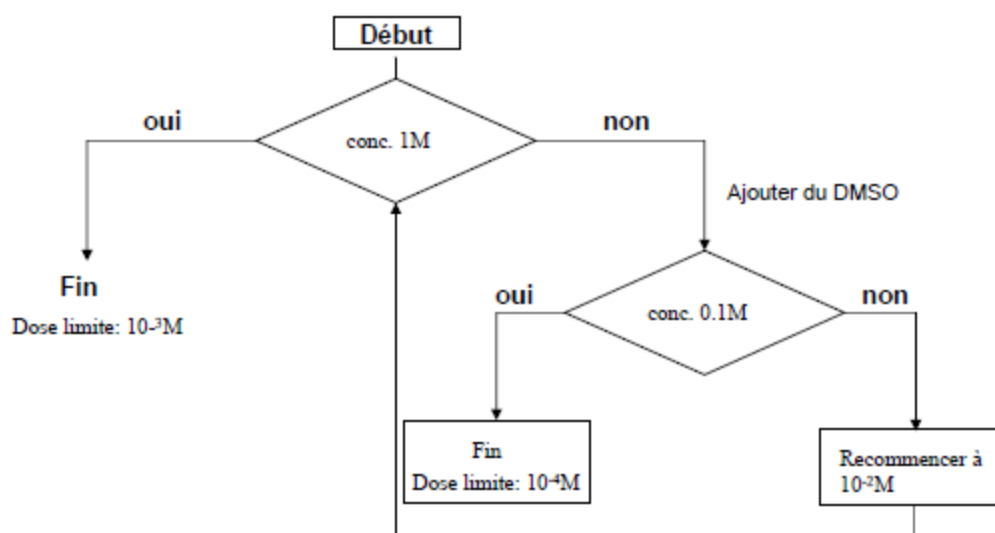
### ***Véhicule***

30. Un solvant approprié est utilisé comme TV concomitant à la même concentration pour les témoins négatif et positif ainsi que pour les produits chimiques d'essai. Les produits chimiques d'essai sont mis en solution dans un solvant capable de les solubiliser et miscible avec le milieu cellulaire. L'eau, l'éthanol (pureté entre 95 % et 100 %) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) peuvent constituer des véhicules acceptés par les cellules donc conviennent à cet effet. Le DMSO est généralement utilisé. Dans ce cas, sa concentration dans le puits ne dépasse pas 0.1 % (v/v). Pour tout autre véhicule (l'éthanol, par exemple), il convient de démontrer que la concentration maximale utilisée n'est pas cytotoxique et qu'elle n'interfère pas avec la performance de l'essai (comme le confirme la réponse de la luciférase de Renilla).

### ***Préparation des produits chimiques d'essai***

31. Les produits chimiques d'essai sont dissous dans un solvant approprié (voir le paragraphe 30) puis fractionnés en séries de solutions diluées au 1/10 dans le même solvant. Pour définir la plus forte concentration de produit chimique d'essai soluble, un essai de solubilité est mené suivant le diagramme du graphique C.2.

Graphique C.2. Diagramme de l'essai de solubilité



Dose limite : la plus forte concentration à soumettre à l'essai  
 Oui : pas de précipitation, Non : précipitation.

32. L'essai de solubilité constitue une étape très importante pour déterminer la concentration maximale applicable à l'essai, et peut influencer sur la sensibilité de l'essai. On sélectionne la concentration maximale de sorte qu'il n'y ait pas de précipitation aux plages de concentration les plus élevées dans un milieu de culture. On prend note des concentrations auxquelles on observe une précipitation, mais ces concentrations ne figurent pas dans l'analyse dose-réponse.

### Évaluation de la cytotoxicité

33. Dans le cas des antagonistes de l'AR, l'interprétation des données doit prendre en compte l'influence de degrés de cytotoxicité croissants pouvant altérer de façon importante, voire éliminer, la réponse sigmoïde type. On peut évaluer la cytotoxicité en mesurant l'activité de la luciférase de Renilla dans la lignée cellulaire AR-EcoScreen™, qui a été établie, à l'origine, pour exprimer la luciférase de Renilla de manière constitutive. En conséquence, il convient d'évaluer l'activation transcriptionnelle médiée par l'AR et la cytotoxicité simultanément dans la même plaque d'essai. Dans le cas des agonistes de l'AR, la cytotoxicité peut également influencer sur la forme de la courbe concentration-réponse. Dans ce cas, il convient d'évaluer la cytotoxicité d'après les résultats de l'essai antagoniste auquel le produit chimique a été soumis.

34. Si les résultats de l'essai de cytotoxicité indiquent que la concentration du produit chimique d'essai a engendré une inhibition égale ou supérieure à 20 % de l'activité de la luciférase de Renilla, cette concentration est alors considérée comme cytotoxique, et toutes les concentrations égales ou supérieures à ce seuil de cytotoxicité sont exclues de l'évaluation. Il convient d'envisager de réduire la concentration maximale si un effet cytotoxique intrinsèque est observé à l'issue de l'épreuve préliminaire réalisée avec le produit chimique d'essai. La cytotoxicité (%) de chaque puits est calculée à l'aide des formules suivantes, et le calcul de la moyenne obtenue pour les puits tripliqués de même concentration permet de déterminer la cytotoxicité (%) de chaque concentration des produits chimiques d'essai.

Essai agoniste :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{URL de chaque puits} - \text{Moyenne des URL de TP}_{CT}}{\text{Moyenne des URL de TV} - \text{Moyenne des URL de TP}_{CT}} \right) \times 100$$

Essai antagoniste :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{URL de chaque puits} - \text{Moyenne des URL de TP}_{CT}}{\text{Moyenne des URL d'AGref} - \text{Moyenne des URL de TP}_{CT}} \right) \times 100$$

### ***Exposition aux produits chimiques d'essai et configuration de la plaque d'essai***

35. Dans l'essai agoniste de l'AR, chaque produit chimique d'essai fait l'objet d'une dilution en série dans du DMSO, ou un solvant approprié, au moyen d'une seule colonne en polypropylène ou d'un autre appareil approprié, puis est déposé dans les puits d'une plaque microtitre de façon à obtenir les séries de concentrations finales de l'essai, à partir de la concentration maximale déterminée grâce à l'essai de solubilité avec un rapport de dilution généralement de 10 (1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM et 1 nM [ $10^{-3}$ - $10^{-9}$  M], par exemple) pour les essais en triplicat.

36. Pour chaque concentration d'essai du produit chimique d'essai, le mode opératoire suivant peut être appliqué pour diluer le produit chimique (étapes 1 et 2) et exposer les cellules (étape 3) :

- Étape 1. Dilution du produit chimique : diluer 10 µL du produit chimique d'essai dans le solvant pour obtenir 90 µL de milieu.
- Étape 2. Diluer 10 µL du produit chimique d'essai dilué préparé à l'étape 1 dans 90 µL de milieu.
- Étape 3. Exposition des cellules au produit chimique : ajouter 10 µL de la solution diluée de produit chimique d'essai (préparée à l'étape 2) dans un puits d'essai contenant  $9 \times 10^3$  cellules/90 µL/puits.
  - Le volume final de milieu recommandé dans chaque puits est de 100 µL.

37. Les étalons de référence et les échantillons d'essai peuvent être répartis comme indiqué dans les tableaux C.2a et C.3a.

Tableau C.2a Exemple de répartition des concentrations d'étalons de référence sur la plaque d'essai pour l'essai agoniste

Ligne	DHT			Mestanolone			DEHP			Produit chimique d'essai#		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 µM	→	→	1 µM	→	→	10 µM	→	→	1 mM	→	→
B	100 nM	→	→	100 nM	→	→	1 µM	→	→	100 µM	→	→
C	10 nM	→	→	10 nM	→	→	100 nM	→	→	10 µM	→	→
D	1 nM	→	→	1 nM	→	→	10 nM	→	→	1 µM	→	→
E	100 pM	→	→	100 pM	→	→	1 nM	→	→	100 nM	→	→
F	10 pM	→	→	10 pM	→	→	100 pM	→	→	10 nM	→	→
G	1 pM	→	→	1 pM	→	→	10 pM	→	→	1 nM	→	→
H	TV	→	→	→	TP <sub>AGO</sub>	→	→	→	TP <sub>CT</sub>	→	→	→

TV : témoin véhicule (DMSO) ;

TP<sub>AGO</sub> : témoin positif agoniste de l'AR (10 nM de DHT) ;

TP<sub>CT</sub> : témoin de cytotoxicité positif (10 µg/mL de cycloheximide) ;

# : La concentration de produit chimique d'essai est un exemple.

38. Dans l'essai antagoniste de l'AR, chaque produit chimique d'essai fait l'objet d'une dilution en série dans du DMSO, ou un solvant approprié, au moyen d'une seule colonne en polypropylène ou d'un autre appareil approprié, puis est déposé dans les puits d'une plaque microtitre de façon à obtenir les séries de concentrations finales de l'essai, à partir de la concentration maximale déterminée grâce à l'essai de solubilité avec un rapport de dilution généralement de 10 (1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM et 10 nM [ $1.0 \times 10^{-3}$ - $1.0 \times 10^{-8}$  M], par exemple) pour des essais en triplicat.

39. Pour chaque concentration d'essai du produit chimique d'essai, le mode opératoire suivant peut être appliqué pour diluer le produit chimique (étapes 1 et 2) et exposer les cellules (étape 3) :

- Étape 1. Dilution du produit chimique : diluer 10 µL du produit chimique d'essai dans le solvant pour obtenir 90 µL de milieu contenant 56 nM de DHT/DMSO\*.
- Étape 2. Diluer 10 µL du produit chimique d'essai dilué à l'étape 1 dans 90 µL de milieu.
- Étape 3. Exposition des cellules au produit chimique : ajouter 10 µL de la solution diluée de produit chimique d'essai (préparée à l'étape 2) dans un puits d'essai contenant  $9 \times 10^3$  cellules/90 µL/puits.
  - Le volume final de milieu recommandé dans chaque puits est de 100 µL.
  - \* Ajouter 56 nM de DHT/DMSO pour obtenir 500 pM de DHT, 0.1 % de DMSO après dilution.

40. Les étalons de référence et les échantillons d'essai peuvent être répartis comme indiqué dans les tableaux C.2b et C.3b.

Tableau C.2b. Exemple de répartition des concentrations d'étalons de référence dans la plaque d'essai pour l'essai antagoniste

Ligne	HF			Bisphénol A			DEHP			Produit chimique d'essai#		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 µM	→	→	10 µM	→	→	10 µM	→	→	1 mM	→	→
B	1 µM	→	→	1 µM	→	→	1 µM	→	→	100 µM	→	→
C	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	10 µM	→	→
D	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	1 µM	→	→
E	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	100 nM	→	→
F	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	10 nM	→	→
G	AGref	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	TV	→	→	TP <sub>AGO</sub>	→	→	TP <sub>ATG</sub>	→	→	TP <sub>CT</sub>	→	→

TV : témoin véhicule (DMSO) ;

TP<sub>AGO</sub> : témoin positif agoniste de l'AR (10 nM de DHT) ;

AGref : étalon de référence agoniste de l'AR (DMSO)

TP<sub>ATG</sub> : témoin positif antagoniste de l'AR (1 µM d'HF) ;

TP<sub>CT</sub> : témoin de cytotoxicité positif (10 µg/mL de cycloheximide) ;

\*\* Les puits grisés sont additionnés de 500 pM de DHT.

# : La concentration de produit chimique d'essai est un exemple.

**41.** Les étalons de référence (DHT, mestanolone et DEHP pour l'essai agoniste ; HF, BPA et DEHP pour l'essai antagoniste) sont testés lors de chaque épreuve (comme indiqué dans les tableaux C.2a et C.2b). Pour l'essai agoniste, chaque plaque d'essai inclut des puits contenant 10 nM de DHT (TP<sub>AGO</sub>), des puits traités avec du DMSO (ou un solvant approprié) seul (TV) ainsi qu'un témoin de cytotoxicité (TP<sub>CT</sub>, 10 µg/mL de cycloheximide) (tableau C.3a). Pour l'essai antagoniste, chaque plaque d'essai inclut un témoin positif agoniste de l'AR (TP<sub>AGO</sub>, 10 nM de DHT), un étalon de référence agoniste de l'AR (AGref, un mélange de 500 pM de DHT et de DMSO ou d'un solvant approprié), un témoin positif antagoniste de l'AR (TP<sub>ATG</sub>, un mélange de 500 pM de DHT et de 1 µM d'HF) et un témoin de cytotoxicité (TP<sub>CT</sub>, 10 µg/mL de cycloheximide) (tableau C.3b). Si des cellules issues de sources différentes (divergeant par leur nombre de passages ou leur lot d'origine, par exemple) sont utilisées au cours de la même épreuve, il convient de tester les étalons de référence avec chacune de ces sources cellulaires.



Tableau C.3a. Exemple de répartition des concentrations de produits chimiques d'essai et de produits chimiques témoins dans la plaque d'essai (essai agoniste)

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

TV : témoin véhicule (DMSO) ;

TP<sub>AGO</sub> : témoin positif agoniste de l'AR (10 nM de DHT) ;

TP<sub>CT</sub> : témoin de cytotoxicité positif (10 µg/mL de cycloheximide) ;

La concentration de produit chimique d'essai est un exemple.

Table C.3b. Exemple de répartition des concentrations de produits chimiques d'essai et de produits chimiques témoins dans la plaque d'essai (essai antagoniste)

Ligne	Produit chimique d'essai 1			Produit chimique d'essai 2			Produit chimique d'essai 3			Produit chimique d'essai 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	conc 1 (10 µM)	→	→	1 mM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	conc 2 (1 µM)	→	→	100 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	conc 3 (100 nM)	→	→	10 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	conc 4 (10 nM)	→	→	1 µM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	conc 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	conc 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	100 pM	→	→
G	AGref	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	TV	→	→	TP <sub>AGO</sub>	→	→	TP <sub>ATG</sub>	→	→	TP <sub>CT</sub>	→	→

TV : témoin véhicule (DMSO) ;

TP<sub>AGO</sub> : témoin positif agoniste de l'AR (10 nM de DHT) ;

AGref : étalon de référence agoniste de l'AR (DMSO) ;

TP<sub>ATG</sub> : témoin positif antagoniste de l'AR (1 µM d'HF) ;

TP<sub>CT</sub> : témoin de cytotoxicité positif (10 µg/mL de cycloheximide) ;

\*\* Les puits grisés sont additionnés de 500 pM de DHT.

La concentration de produit chimique d'essai est un exemple.

43. Il convient de confirmer l'absence d'effets de bord, le cas échéant, et en cas de suspicion, de modifier la répartition sur la plaque de façon à éliminer de tels effets, par exemple en n'utilisant pas les puits situés sur les bords.

44. Après l'ajout des produits chimiques, il convient de placer les plaques d'essai dans un incubateur à 5 % de CO<sub>2</sub>, à 37±1 °C pendant 20 à 24 heures, afin d'induire la synthèse des produits du gène rapporteur.

45. Lorsque les produits chimiques sont hautement volatils, des considérations particulières s'appliquent. Dans ce cas, les puits témoins adjacents peuvent en effet induire des faux positifs, d'où la nécessité d'effectuer des comparaisons avec les valeurs témoins attendues et historiques. Dans les rares cas où la volatilité pourrait se révéler problématique, il est recommandé d'utiliser un dispositif d'étanchéité afin d'isoler efficacement les puits les uns des autres pendant le déroulement de l'essai.

46. Pour un même produit chimique, les essais définitifs sont répétés à des jours différents, avec des réactifs d'essai et des dilutions de produits chimiques d'essai fraîchement préparés, afin de garantir l'indépendance des résultats. Dans le cas où plusieurs produits chimiques sont testés en même temps au cours d'une même épreuve, il est préférable de maintenir la même répartition sur les plaques tout en changeant l'ordre dans lequel les produits chimiques sont ajoutés aux puits pour éviter les effets liés à la localisation du produit chimique.

### Mesure de l'activité de la luciférase

47. Il est préférable d'utiliser un système d'essai à deux rapporteurs commercial (par exemple, Promega, E2920, ou équivalent) pour détecter la réponse de l'AR (activité de la luciférase de luciole) et la cytotoxicité (activité de la luciférase de Renilla) simultanément, tant que les critères d'acceptabilité sont satisfaits. Il convient de choisir les réactifs d'essai en fonction de la sensibilité du luminomètre utilisé. Les instructions à suivre sont celles du fabricant, avec les modifications ci-après. Par exemple, dans le cas

d'un système d'essai luciférase Dual-Glo (Promega, E2920), retirer 60 µL de surnageant de l'un des puits de la plaque d'essai avant d'ajouter le substrat, puis ajouter 40 µL du premier substrat directement dans les puits et mesurer les signaux émis par la luciférase de luciole. Enfin, ajouter 40 µL du second substrat dans les puits de la plaque d'origine pour détecter l'activité de la luciférase de Renilla. Il est possible d'utiliser un réactif d'essai luciférase [par exemple, le système d'essai luciférase Steady-Glo® (Promega, E2510, ou équivalent)] ou un système d'essai luciférase standard (Promega, E1500, ou équivalent) pour détecter uniquement la réponse de l'AR (activité de la luciférase de luciole). Si l'on utilise le système d'essai luciférase Steady-Glo® (Promega, E2510), ajouter directement dans les puits 40 µL du réactif préparé. Si l'on utilise un système d'essai luciférase standard (Promega, E1500, ou équivalent), ajouter le substrat après l'ajout du réactif de lyse cellulaire (Promega, E1531, ou équivalent).

### Analyse des données

48. Dans l'essai agoniste, l'activité transcriptionnelle relative du témoin positif (10 nM de DHT) est obtenue par analyse des signaux luminescents d'une même plaque suivant les étapes ci-après (d'autres calculs mathématiques équivalents sont aussi acceptables) :

- Étape 1. Calculer la valeur moyenne correspondant au témoin véhicule (TV).
- Étape 2. Soustraire cette moyenne de la valeur obtenue pour chaque puits afin de supprimer l'éventuel effet de bruit généré par le véhicule.
- Étape 3. Calculer la moyenne des valeurs corrigées obtenues pour le TP<sub>AGO</sub> (autrement dit, le TP<sub>AGO</sub> normalisé).
- Étape 4. Diviser la valeur corrigée obtenue pour chaque puits de la plaque par la moyenne du TP<sub>AGO</sub> normalisé (le TP<sub>AGO</sub> est fixé à 100 %).  
Le résultat final obtenu pour chaque puits correspond à l'activité transcriptionnelle relative de ce puits par rapport à la réponse du TP<sub>AGO</sub>.
- Étape 5. Calculer la valeur moyenne de l'activité transcriptionnelle relative pour chaque concentration du produit chimique d'essai. Les résultats livrent deux informations : l'activité transcriptionnelle moyenne (réponse) et la concentration induisant cette réponse (voir les paragraphes 51 à 60).

49. Dans l'essai antagoniste, l'activité transcriptionnelle relative est obtenue par analyse des signaux luminescents d'une même plaque suivant les étapes ci-après (d'autres calculs mathématiques équivalents sont aussi acceptables) :

- Étape 1. Calculer la valeur moyenne correspondant au TV.
- Étape 2. Soustraire cette moyenne de la valeur obtenue pour chaque puits afin de supprimer l'éventuel effet de bruit généré par le véhicule.
- Étape 3. Calculer la moyenne des valeurs corrigées obtenues pour l'AGref (autrement dit, l'AGref normalisé).
- Étape 4. Diviser la valeur corrigée obtenue pour chaque puits de la plaque par la moyenne de l'AGref normalisé (l'AGref est fixé à 100 %).

50. Le résultat final obtenu pour chaque puits correspond à l'activité transcriptionnelle relative de ce puits par rapport à la réponse maximale de l'AGref.

- Étape 5. Calculer la valeur moyenne de l'activité transcriptionnelle relative pour chaque groupe de concentration du produit chimique d'essai. Les résultats livrent deux informations : l'activité transcriptionnelle moyenne (réponse) et la concentration induisant cette réponse (voir les paragraphes 51 à 60).

*Calcul des paramètres  $CE_{50}$ ,  $\log TP_{50}$ ,  $\log TP_{10}$ ,  $\log CI_{50}$  et  $\log CI_{30}$  (avec l'induction)*

51. Le calcul de la  $CE_{50}$  se fonde sur une courbe concentration-réponse complète, dont le relevé n'est pas toujours possible ou pratique en raison d'éventuelles limitations de la plage de concentrations (par exemple en cas de problèmes de cytotoxicité ou de solubilité). Cependant, comme la  $CE_{50}$  et le niveau d'induction maximum (correspondant à la valeur maximale de l'équation de Hill) sont des valeurs informatives, il convient d'en rendre compte dans la mesure du possible. Le calcul de la  $CE_{50}$  et du niveau d'induction maximum s'effectue à l'aide d'un logiciel statistique adapté, comme Graphpad Prism.

52. Si l'équation logistique de Hill s'applique aux données concentration-réponse, la  $CE_{50}$  se calcule avec l'équation suivante (13) :

- $Y = \text{base} + (\text{sommet} - \text{base}) / [1 + 10 \exp((\log CE_{50} - X) \times \text{pente de Hill})]$
- où : X est le logarithme de la concentration ;
- et Y est la réponse, mesurée entre la base et le sommet de la courbe sigmoïde. La base est fixée à zéro dans l'équation logistique de Hill.

53. Pour évaluer la cytotoxicité, il convient d'exprimer la viabilité cellulaire en pourcentage de l'activité de la luciférase de Renilla des puits contenant les produits chimiques par rapport à l'activité moyenne de la luciférase de Renilla des puits témoins contenant le véhicule dans l'essai agoniste, ou l'activité moyenne de la luciférase de Renilla des puits contenant l'AGref (500 pM de DHT) dans l'essai antagoniste, conformément aux équations du paragraphe 34.

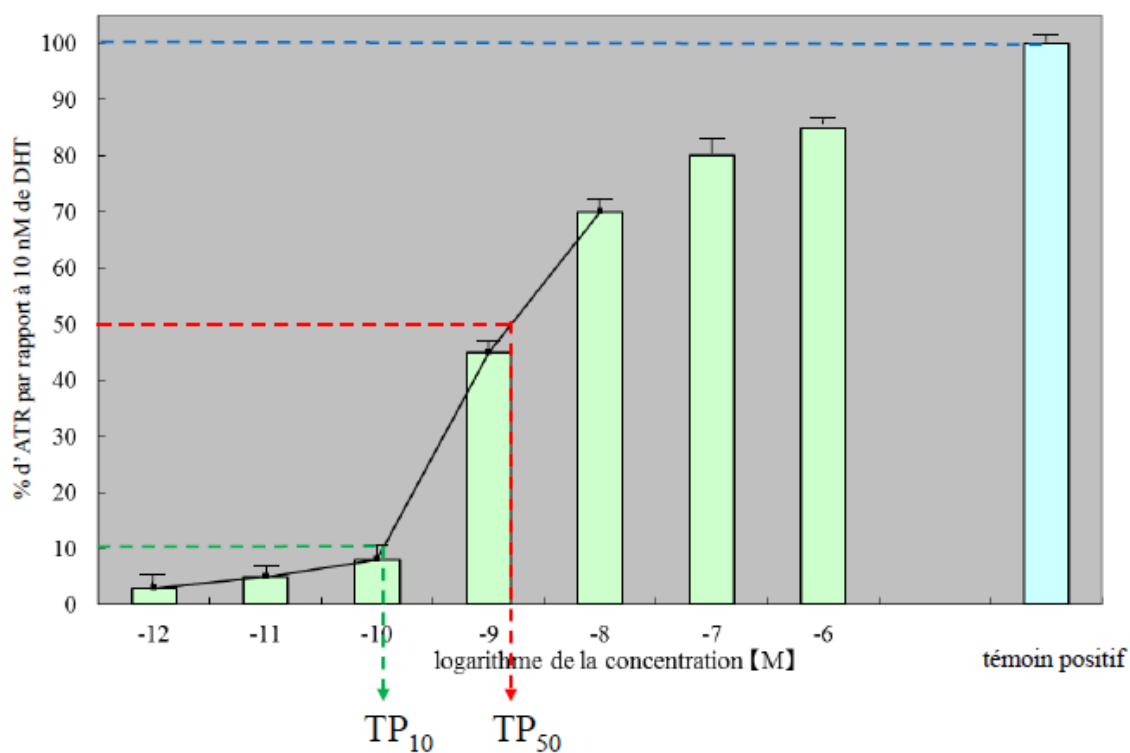
54. Dans le cas de l'essai agoniste, il convient de fournir les données suivantes pour chacun des produits chimiques d'essai :

- (i) Le niveau maximum de réponse induite par un produit chimique d'essai, exprimé en pourcentage de la réponse induite par le  $TP_{AGO}$  (10 nM de DHT) de la même plaque ( $RTP_{\max}$ ).
- (ii) Pour les produits chimiques positifs, les concentrations induisant un effet équivalent à 10 % de l'effet du produit chimique de référence DHT ( $\log TP_{10}$ ) et, le cas échéant, 50 % de l'effet du produit chimique de référence DHT ( $\log TP_{50}$ ).

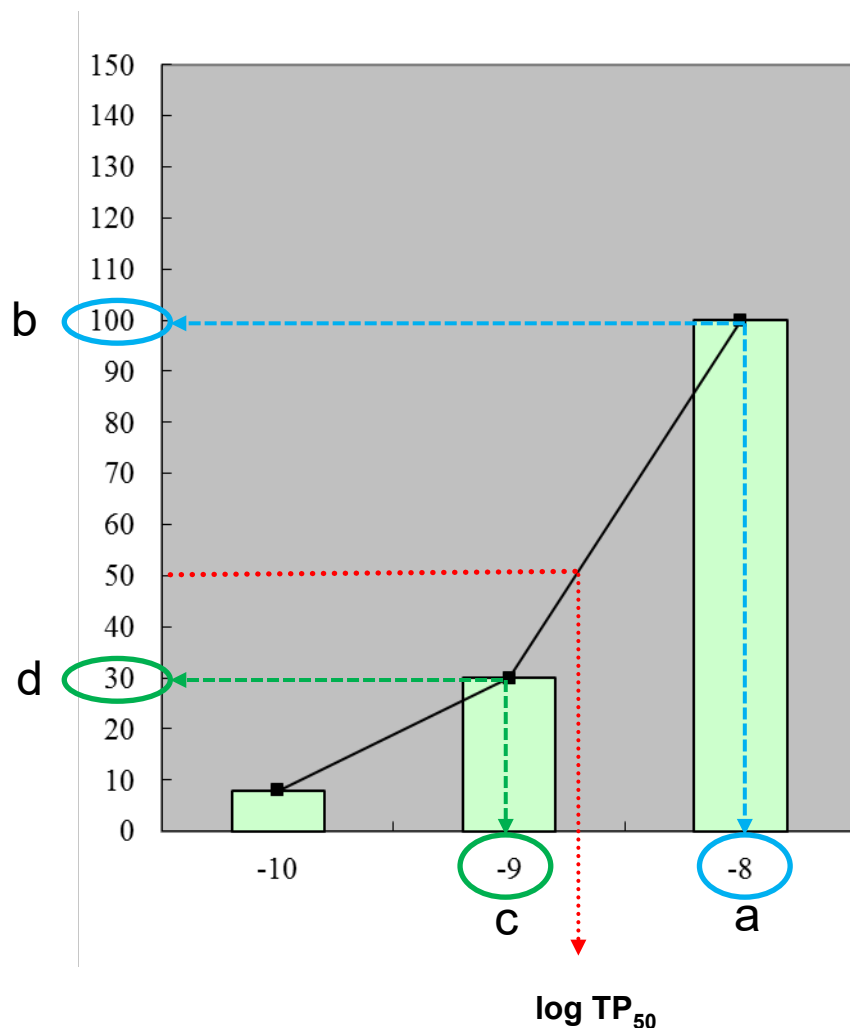
55. Le graphique C.3 décrit les valeurs  $\log TP_x$ , « x » étant une réponse sélectionnée comme 10 % ou 50 % de l'induction du  $TP_{AGO}$ . Les valeurs  $\log TP_{10}$  et  $\log TP_{50}$  peuvent être définies comme les concentrations du produit chimique d'essai dont on estime qu'elles induisent 10 % et 50 %, respectivement, de l'activité transcriptionnelle induite par le  $TP_{AGO}$  (témoin agoniste de l'AR ; 10 nM de DHT). Chaque valeur  $\log TP_x$  peut être calculée à l'aide d'une régression linéaire simple à deux variables pour l'activité transcriptionnelle. Considérant que les points immédiatement au-dessus et en-dessous de la valeur  $\log TP_x$  ont pour coordonnées respectives (a,b) et (c,d), la valeur  $\log TP_x$  est calculée à l'aide de la formule suivante et du graphique C.3 :

$$\text{Log}[TP_x] = c + [(x-d)/(b-d)](a-c)$$

Graphique C.3. Schéma descriptif des valeurs logTP<sub>x</sub>



Dans l'essai agoniste, chaque plaque d'essai inclut le TP<sub>AGO</sub> (témoin agoniste de l'AR ; 10 nM de DHT).  
 ATR : activité transcriptionnelle relative

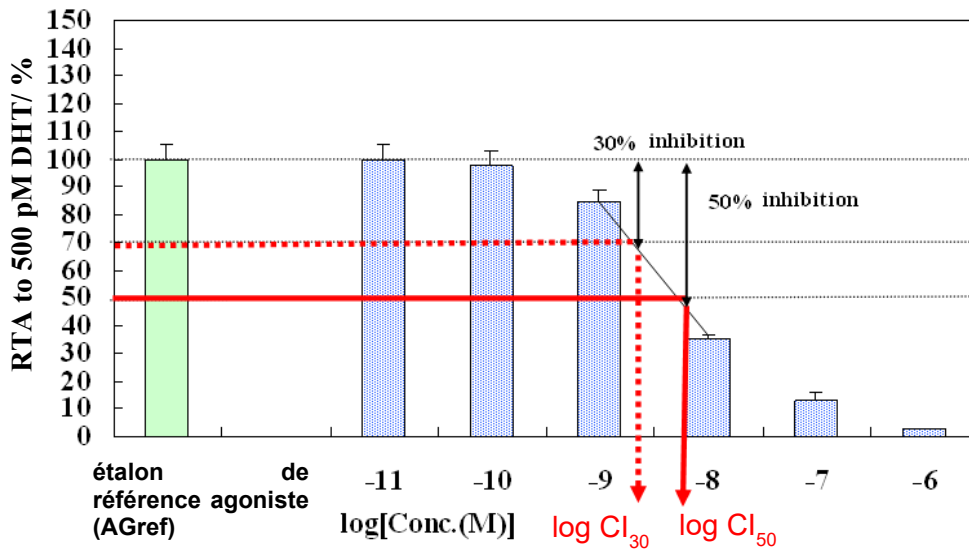
Figure C.4. Exemple de calcul de  $\log TP_{50}$ 

56. Dans le cas de l'essai antagoniste, il convient de fournir les données suivantes pour chacun des produits chimiques d'essai positifs : les concentrations correspondant à une inhibition de 30 % ( $\log CI_{30}$ ) et, le cas échéant, 50 % ( $\log CI_{50}$ ) de l'activité transcriptionnelle induite par 500 pM de DHT.

57. Le graphique C.5 décrit les valeurs  $\log CI_x$ , « x » étant une réponse sélectionnée comme 30 % ou 50 % d'inhibition par rapport aux témoins contenant de la DHT. Les valeurs  $\log CI_{50}$  et  $\log CI_{30}$  peuvent être définies comme les concentrations du produit chimique d'essai dont on estime qu'elles provoquent une inhibition de 50 % et 30 %, respectivement, de l'activité transcriptionnelle induite par 500 pM de DHT. La méthode de calcul peut être la même que pour  $\log TP$ . Chaque valeur  $\log CI_x$  peut être calculée à l'aide d'une régression linéaire simple à deux variables pour l'activité transcriptionnelle. Considérant que les points immédiatement au-dessus et en-dessous de la valeur  $\log CI_x$  ont pour coordonnées respectives (c,d) et (a,b), la valeur  $\log CI_x$  est calculée à l'aide de la formule suivante et du graphique C.5 :

$$\text{Log}[CI_x] = a - [(b - (100 - x)) / (b - d)] (a - c)$$

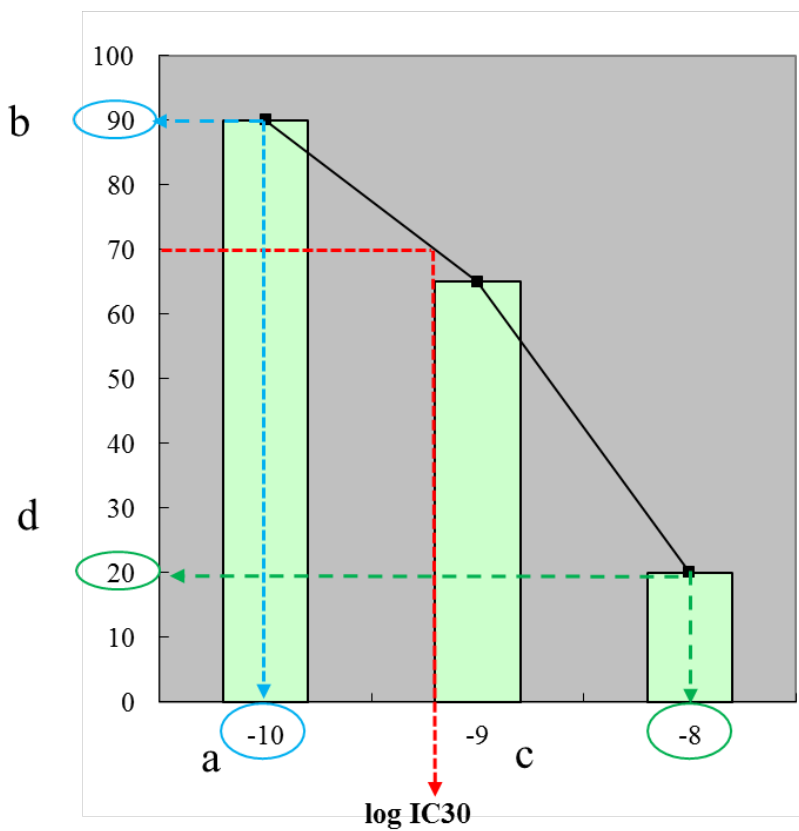
Graphique C.5. Schéma descriptif des valeurs logCI



Dans l'essai antagoniste, chaque plaque inclut l'AGref (DMSO à 0.1 % additionné de 500 pM de DHT).

ATR : activité transcriptionnelle relative

Graphique C.6. Exemple de calcul des valeurs logIC30



58. Pour faire la distinction entre un effet antagoniste pur et une baisse de l'activité de la luciférase due à la cytotoxicité, la lignée cellulaire AR-EcoScreen™ est conçue pour exprimer deux types de luciférase : la luciférase de luciole dont l'expression est inductible par les éléments de réponse aux androgènes, et la luciférase de Renilla dont l'expression est stable et non inductible.

59. L'utilisation d'un système d'essai à deux rapporteurs permet d'évaluer à la fois la viabilité cellulaire et l'effet antagoniste sur des cellules identiques et sur une même plaque d'essai. La réponse du témoin de cytotoxicité (TP<sub>CT</sub>, 10µg/mL de cycloheximide) permet de tenir compte de l'activité de la luciférase de Renilla par soustraction des valeurs TP<sub>CT</sub> – les « activités de la luciférase de Renilla » – de celles de tous les puits d'échantillonnage. Pour évaluer la véritable cytotoxicité des produits chimiques à l'aide de la lignée cellulaire AR-EcoScreen™, il convient d'utiliser cette viabilité cellulaire révisée. Si la viabilité cellulaire est inférieure à 80 % à la concentration spécifique d'un produit chimique d'essai, le ou les points de données correspondants sont exclus.

60. Il convient que les résultats, c'est-à-dire l'évaluation positive ou négative du produit chimique d'essai, s'appuient sur au moins deux ou trois épreuves indépendantes. Si deux épreuves livrent des résultats comparables et reproductibles, une troisième n'est pas nécessaire. Pour être acceptables, les résultats doivent :

- satisfaire aux critères d'acceptabilité (voir les paragraphes 21 à 29)
- être reproductibles en triplicat (CV<20 %).

### Critères d'interprétation des données

61. **Pour l'essai agoniste**, les critères d'interprétation des données sont présentés dans le tableau C.4a. Les résultats positifs se caractérisent à la fois par l'amplitude de l'effet induit et par la concentration à laquelle cet effet se produit. L'expression des résultats sous forme de concentration induisant une réponse égale à 50 % (logTP<sub>50</sub>) ou 10 % (logTP<sub>10</sub>) de celle du TP permet de répondre à cet objectif. Cependant, un produit chimique d'essai sera jugé positif si la réponse maximale qu'il induit (RTP<sub>max</sub>) est supérieure ou égale à 10 % de la réponse du produit chimique de référence dans au moins deux épreuves sur deux ou deux épreuves sur trois ; il sera jugé négatif si la RTP<sub>max</sub> demeure inférieure à 10 % de la réponse du produit chimique de référence dans deux épreuves sur deux ou deux épreuves sur trois.

**Tableau C.4a. Critères de décision (résultat positif ou négatif) dans le cas de l'essai agoniste**

<b>Positif</b>	Si la RTP <sub>max</sub> obtenue est supérieure ou égale à 10 % de la réponse du témoin positif.
<b>Négatif</b>	Si la RTP <sub>max</sub> obtenue demeure inférieure à 10 % de la réponse du témoin positif.

62. **Pour l'essai antagoniste**, les critères d'interprétation des données sont présentés dans le tableau C.4b. Les résultats positifs se caractérisent à la fois par l'amplitude de l'effet induit et par la concentration à laquelle cet effet se produit. L'expression des résultats sous forme de concentration induisant une réponse égale à 50 % (logCI<sub>50</sub>) ou 30 % (logCI<sub>30</sub>) de celle du TP permet de répondre à cet objectif. Cependant, un produit chimique d'essai sera jugé positif si les valeurs logCI<sub>30</sub> ont pu être calculées dans au moins deux épreuves sur deux ou deux épreuves sur trois ; il sera jugé négatif si les valeurs logCI<sub>30</sub> n'ont pas pu être calculées dans deux épreuves sur deux ou deux épreuves sur trois.



Table C.4b. Critères de décision (résultat positif ou négatif) dans le cas de l'essai antagoniste

<b>Positif</b>	Si les valeurs $\log\text{Cl}_{30}$ ont pu être calculées.
<b>Négatif</b>	Si les valeurs $\log\text{Cl}_{30}$ n'ont pas pu être calculées.

63. Il est possible de calculer les valeurs  $\log\text{TP}_{10}$ ,  $\log\text{TP}_{50}$  et  $\text{TP}_{\text{max}}$  pour l'essai agoniste et les valeurs  $\log\text{Cl}_{50}$  et  $\log\text{Cl}_{30}$  pour l'essai antagoniste à l'aide d'une feuille de calcul disponible avec la présente Ligne directrice pour les essais sur le site web public de l'OCDE.

64. Obtenir au moins deux fois les valeurs  $\log\text{TP}_x$  et  $\log\text{Cl}_x$  devrait suffire. Néanmoins, si le niveau de référence des données dans une même plage de concentrations présente un coefficient de variation (CV) élevé, il convient de considérer que la fiabilité de ces données est faible, et d'identifier l'origine d'une telle variation. Il convient que le CV des données tripliquées brutes (c'est-à-dire des données sur l'intensité de la luminescence) correspondant aux points de données d'une même plaque d'essai utilisés pour calculer les  $\log\text{TP}_x$  et  $\log\text{Cl}_x$  soit inférieur à 20 %. En cas de suspicion d'un résultat équivoque ou non concluant, il est possible de prévoir une nouvelle épreuve ou une nouvelle vérification.

65. Le respect des critères d'acceptabilité indique que le système d'essai fonctionne correctement, mais ne garantit pas que chaque épreuve fournira des données exactes. La duplication des résultats de la première épreuve constitue la meilleure assurance que les données obtenues sont correctes.

## Bibliographie

1. Escande, A., et al. (2006), Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
2. Kuiper, G.G., et al. (1998), Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139, 4252-4263.
3. Tarnow, P., Tralau, T., Hunecke, D., Luch, A. (2013), Effects of triclocarban on the transcription of estrogen, androgen and aryl hydrocarbon receptor responsive genes in human breast cancer cells. *Toxicology In Vitro*. 27, 1467-1475.
4. Satoh, K., Nonaka, R., Ohyama, K., Nagai, F. (2005), Androgenic and antiandrogenic effects of alkylphenols and parabens assessed using the reporter gene assay with stably transfected CHO-K1 cells (AR-EcoScreen). *Journal of Health Science*, 51(5), 557–568.
5. Wilson V. S., Bobseine K., Lambright C. R. and Gray Jr. L. E., (2002), A Novel Cell Line, MDA-kb2, That Stably Expresses an Androgen- and Glucocorticoid-Responsive Reporter for the Detection of Hormone Receptor Agonists and Antagonists. *Toxicological Sciences*. 66 (1): 69-81.
6. OECD (2016), Validation report of Androgen Receptor (AR) Mediated Stably Transfected Transactivation (AR STTA) Assay to Detect Androgenic and Anti-androgenic Activities, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No.241), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
7. Araki N, Ohno K, Nakai M, Takeyoshi M, Iida M. (2005) Screening for androgen receptor activities in 253 industrial chemicals by *in vitro* reporter gene assays using AR-EcoScreen cells. *Toxicology In Vitro*. 19(6):831-842.
8. Araki N, Ohno K, Takeyoshi M, Iida M. (2005) Evaluation of a rapid *in vitro* androgen receptor transcriptional activation assay using AR-EcoScreen cells. *Toxicology In Vitro*. 19(3):335-352.
9. Zwart, N, Andringa, D, de Leeuw, W-J, Kojima, H, Iida, M, Houtman, C J, de Boer, J, Kool, J, Lamoree, M H, Hamers, T. (2017). Improved androgen specificity of AR-EcoScreen by CRISPR based glucocorticoid receptor knockout. *Toxicology in Vitro*. 45, 1–9.
10. Spaepen, M., Angulo, A.F., Marynen, P. and Cassiman, J.J. (1992), Detection of bacterial and mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett*. 78(1), 89-94.
11. Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M. and Ishii H (1995), Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci*. 57(4), 769-771.
12. Dussurget, O. and Roulland-Dussoix D. (1994), Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera. *Appl. Environ. Microbiol*. 60(3), 953-959.
13. De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves. *American Journal of Physiology*, 235, E97-102.

## Annexe C.1

### *Faux positifs : évaluation des signaux luminescents non médiés par l'AR*

1. Les faux positifs peuvent avoir pour origine une activation du gène de la luciférase non médiée par l'AR, l'activation directe du produit du gène, ou une luminescence de source indéterminée. On repère de tels effets à une courbe dose-réponse incomplète ou inhabituelle. En cas de suspicion, il convient d'examiner l'effet d'un antagoniste de l'AR [hydroxyflutamide (HF) à une concentration non toxique, par exemple] sur la réponse.
2. Pour garantir la validité de cette approche, il convient de tester l'activité agoniste des éléments suivants sur une même plaque :
  - produit chimique en la présence et en l'absence d'1 µM d'HF (en triplicat)
  - TV (en triplicat)
  - 1 µM d'HF (en triplicat)
  - 500 pM de DHT (en triplicat) comme TP<sub>AGO</sub>

### *Critères d'interprétation des données*

3. Note : tous les puits contiennent la même concentration de véhicule.
  - Si l'activité agoniste du produit chimique n'est PAS modifiée par le traitement à l'hydroxyflutamide (HF), le résultat est considéré comme « négatif ».
  - Si l'activité agoniste du produit chimique est inhibée, appliquer les critères de décision (Tableau C.5a).
  - Si l'activité agoniste à n'importe quelle concentration d'essai est inhibée par le traitement avec 1 µM d'HF (antagoniste de l'AR), il convient de calculer la différence entre les réponses relatives aux puits n'ayant pas reçu l'antagoniste de l'AR et celles relatives aux puits l'ayant reçu. Cette différence est alors considérée comme la véritable réponse et est utilisée pour le calcul des paramètres nécessaires à la décision de classement du produit chimique.

$$\text{Véritable réponse} = (\text{Réponse sans HF}) - (\text{Réponse avec HF})$$

### *Analyse des données*

4. Vérifier les critères d'acceptabilité.
5. Vérifier le CV entre les puits traités dans les mêmes conditions.
  - a Calculer la moyenne des valeurs obtenues avec le TV.
  - b Soustraire la moyenne des valeurs obtenues avec le TV de la valeur obtenue pour chaque puits **non** traité avec l'HF.
  - c Calculer la moyenne des valeurs obtenues avec l'HF.
  - d Soustraire la moyenne des valeurs obtenues avec le TV de la valeur obtenue pour chaque puits traité avec de l'hydroxyflutamide (HF).
  - e Calculer la moyenne des valeurs obtenues avec le TP<sub>AGO</sub>.
  - f Calculer l'activité transcriptionnelle relative de tous les autres puits par rapport au TP<sub>AGO</sub>.

## Annex D. (méthode 2) Essai de transactivation médiée par les récepteurs des androgènes visant la détection de l'activité androgénique agoniste et antagoniste des produits chimiques et utilisant la lignée cellulaire humaine AR-CALUX® obtenue par transfection stable

### Remarques préliminaires et limites

1. Il convient de lire la section « Introduction générale » avant d'utiliser cette méthode d'essai (corps du texte, pages 6-9).
2. L'essai d'activation transcriptionnelle AR-CALUX®(\*) utilise la lignée de cellules humaines d'ostéosarcome U2OS AR-CALUX® pour détecter l'activité (anti-)androgénique médiée par les récepteurs des androgènes humains (hAR). La lignée cellulaire AR-CALUX® exprime l'hAR transfecté de façon stable mais n'exprime pas, ou presque pas, les autres récepteurs des hormones stéroïdiennes (1).
3. Cette méthode d'essai est conçue spécifiquement pour détecter l'activation transcriptionnelle médiée par l'AR avec la bioluminescence comme effet mesuré. La bioluminescence est un mode de mesure qu'on utilise souvent dans divers essais biologiques en raison de son rapport signal/bruit élevé (2). Des interférences de produits chimiques avec les signaux de luminescence ont pu être signalées pour certaines lignées cellulaires transformées par la luciférase, mais de telles interférences n'ont pas été observées avec les lignées cellulaires CALUX.
4. La lignée cellulaire a une faible activité métabolique. En combinant la méthode d'essai avec une fraction S9, on peut étudier l'impact du métabolisme sur l'activité du produit chimique d'essai (3) : cette approche est en cours de validation (2020).
5. La présente méthode d'essai a été utilisée aux fins de criblage à haut débit (4). Elle n'a pas fait l'objet d'une validation conformément au document-guide n° 34 de l'OCDE.
6. La présente méthode d'essai est théoriquement applicable à l'évaluation de mélanges ou de substances multiconstituants. Toutefois, lors de l'étude de validation, la plupart des produits chimiques utilisés étaient des substances monoconstituants. Si l'on envisage d'évaluer des mélanges ou des produits chimiques difficiles à tester (produits instables, par exemple), il convient d'examiner d'emblée si les résultats des essais menés donneront des résultats scientifiquement significatifs.
7. L'étude de validation de la méthode d'essai AR-CALUX® en a démontré la fiabilité et la pertinence pour l'objectif visé (5). Le protocole de la méthode d'essai est décrit dans le document de référence (6).
8. Les définitions et abréviations utilisées dans cette méthode d'essai sont fournies à l'annexe A de la présente LD.

## Principe de la méthode d'essai

9. Cette méthode d'essai est utilisée pour évaluer l'activation transcriptionnelle d'un gène rapporteur. Une fois la liaison AR-ligand établie, le complexe récepteur-ligand subit une translocation vers le noyau où il se fixe à des séquences d'ADN spécifiques, qu'on appelle éléments de réponse aux androgènes (ARE), et transactive le gène rapporteur luciférase de luciole, induisant une augmentation de l'expression cellulaire de l'enzyme luciférase. Après l'ajout et l'oxydation catalytique ultérieure de la luciférine (substrat), il y a production de lumière. La lumière produite est facilement détectable et quantifiable à l'aide d'un luminomètre.

10. Le système d'essai proposé dans cette Annexe utilise les cellules AR-CALUX<sup>®</sup> obtenues par transfection stable. Ces cellules AR-CALUX<sup>®</sup> proviennent de la lignée de cellules humaines ostéoblastiques d'ostéosarcome U2OS. Les cellules humaines U2OS ont été obtenues par transfection stable de 3xARE-TATA-Luc et pSG5-neo-hAR à l'aide du procédé de co-précipitation par adjonction de phosphate de calcium. La lignée cellulaire U2OS a été considérée comme une bonne candidate et donc choisie pour servir de lignée cellulaire rapporteuse sensible aux androgènes (et à d'autres hormones stéroïdiennes) car elle présente une activité faible voire nulle du récepteur endogène. L'absence de récepteur endogène a été évaluée uniquement au moyen des plasmides rapporteurs de la luciférase, qui n'ont pas présenté d'activité lors de l'ajout du récepteur-ligand. En outre, cette lignée cellulaire soutenait de fortes réponses à médiation hormonale lors de l'introduction transitoire de récepteurs apparentés (1).

11. L'essai de détection de l'activité (anti-)androgénique des produits chimiques à l'aide de la lignée cellulaire AR-CALUX<sup>®</sup> comprend une épreuve préliminaire suivie d'une épreuve complète et d'un contrôle de la spécificité. Pendant l'épreuve préliminaire, on détermine la solubilité, la cytotoxicité et une gamme affinée de concentrations du produit chimique d'essai en vue de l'épreuve complète. Pendant cette épreuve complète, on évalue l'activité agoniste ou antagoniste du produit chimique d'essai dans la gamme affinée de concentrations, puis on interprète les données. Si c'est l'activité antagoniste qu'on cherche à évaluer, on soumet simultanément le produit chimique d'essai à une épreuve complète et un contrôle de la spécificité.

12. Le contrôle de la spécificité doit permettre de faire la distinction entre les vrais antagonistes compétitifs et les faux positifs (dus à la cytotoxicité, au stress cellulaire ou à l'inhibition non spécifique, par exemple). Pour cela, on expose les cellules à la fois à la concentration  $CE_{50}$  et à la concentration  $100 \times CE_{50}$  de l'étalon de référence agoniste DHT lorsqu'elles sont traitées avec 8 concentrations du produit chimique d'essai. Ceci s'effectue sur une même plaque. Il en résultera deux doses-réponses, dont celle générée par la concentration de ligand la plus élevée ( $100 \times CE_{50}$ ) est décalée vers la droite (voir le graphique D.6). Ce décalage peut être mesuré quantitativement, et un critère d'acceptation a été élaboré ( $R^2$ ). Les critères d'interprétation des résultats sont décrits en détail au paragraphe 70. En résumé, un produit chimique d'essai est considéré comme positif pour l'activité agoniste si au moins deux concentrations consécutives de ce produit provoquent une réponse supérieure ou égale à 10 % de la réponse maximale de l'étalon de référence DHT ( $TP_{10}$ ). Un produit chimique d'essai est considéré comme positif pour l'activité antagoniste si au moins deux concentrations consécutives de ce produit provoquent une réponse inférieure ou égale à 80 % de la réponse maximale de l'étalon de référence flutamide ( $TP_{80}$ ) et si les critères de contrôle de la spécificité sont satisfaits.

## Démonstration de la compétence du laboratoire

13. Avant de tester des produits chimiques dont l'activité est inconnue, il convient que chaque laboratoire démontre sa compétence quant à l'utilisation de cette méthode d'essai. Pour ce faire, chaque laboratoire teste les produits chimiques d'épreuve de compétence figurant dans le tableau B.4a (activité

agoniste) et le tableau B.4b (activité antagoniste) de l'annexe B de la présente LD. Cette procédure permet également de confirmer la réactivité du système d'essai. Les produits chimiques sont testés au moins deux fois, à des jours différents, et les résultats doivent concorder avec les classements et les valeurs des tableaux B.4a et B.4b. En outre, le laboratoire concerné tient à jour une base de données historiques dans laquelle il conserve les résultats obtenus avec les étalons de référence et les témoins contenant le véhicule/solvant pour confirmer la reproductibilité de la méthode d'essai au fil du temps.

## Procédure

### *Lignée cellulaire*

14. Cette méthode d'essai fait appel à la lignée cellulaire U2OS AR-CALUX<sup>®</sup> obtenue par transfection stable. Cette lignée peut être obtenue auprès de *BioDetection Systems BV* (Amsterdam, Pays-Bas) après signature d'un accord de licence technique.

15. Il convient de n'utiliser que des cultures de cellules exemptes de mycoplasmes. On prévoira donc soit d'utiliser des lots de cellules certifiés négatifs en ce qui concerne la contamination par des mycoplasmes, soit d'effectuer un test de détection des mycoplasmes avant utilisation. Pour détecter une infection mycoplasmaïque avec un niveau élevé de sensibilité, il est recommandé d'appliquer une méthode de type RCP (8, 9).

### *Stabilité de la lignée cellulaire*

16. Pour maintenir la stabilité et l'intégrité des cellules AR-CALUX<sup>®</sup>, on les stocke à une température de -130 °C (dans de l'azote liquide, par exemple). Après décongélation de cellules pour lancer une nouvelle culture, on met ces cellules en culture secondaire au moins deux fois avant de les utiliser pour l'évaluation de l'activité (anti-)androgénique des produits chimiques. Il convient de ne plus cultiver les cellules au-delà de 30 passages.

17. Pour contrôler la stabilité de la lignée cellulaire au fil du temps, on vérifie sa sensibilité aux produits chimiques de référence (dans le cadre des essais agoniste et antagoniste) en évaluant la CE<sub>50</sub> ou la CI<sub>50</sub>. On vérifie également l'induction relative du témoin positif (TP) et du témoin négatif (TN). Les résultats doivent répondre aux critères d'acceptabilité de la méthode d'essai AR-CALUX<sup>®</sup> en ce qui concerne l'activité agoniste (tableau D.3) et l'activité antagoniste (tableau D.4). Les étalons de référence, à savoir le produit chimique de référence ainsi que les témoins positif et négatif, sont indiqués dans le tableau D.1 (essai agoniste) et le tableau D.2 (essai antagoniste) avec les concentrations à utiliser.

### *Conditions de dépôt et de culture des cellules*

18. Les cellules AR-CALUX<sup>®</sup> sont cultivées dans un milieu de culture [milieu DMEM/F12 (1:1)] avec rouge de phénol comme indicateur de pH, additionné de 7.5 % de sérum de veau fœtal (SVF), d'acides aminés non essentiels (1 %), de pénicilline (10 unités/mL), de streptomycine (10 µg/mL) et de généticine (G-418) (0.2 mg/mL) comme marqueur de sélection. Les cellules sont placées dans un incubateur à CO<sub>2</sub> (5 % ± 1 % de CO<sub>2</sub>) à 37° ± 1° C, humidifiées. Lorsqu'elles atteignent une confluence de 85-95 %, elles sont soit mises en sous-culture soit préparées pour l'ensemencement dans des plaques microtitres 96 puits. Dans le deuxième cas de figure, les cellules sont remises en suspension à la concentration de 1x10<sup>5</sup> cellules/mL dans le milieu d'essai [DMEM/F12 (1:1)] sans rouge de phénol, additionné de sérum de veau fœtal traité au charbon enrobé de dextrane (5 % v/v), d'acides aminés non essentiels (1 % v/v), de pénicilline (10 unités/mL) et de streptomycine (10 µg/mL), puis déposées dans des plaques microtitres 96 puits (100 µL de suspension cellulaire homogénéisée). Les cellules sont ensuite pré-incubées dans un

incubateur à CO<sub>2</sub> (5 % ± 1 % de CO<sub>2</sub>) à 37° ± 1° C, humidifiées, pendant les 24 heures qui précèdent l'exposition au produit chimique.

19. Avant de commencer une étude, on examine tous les appareils (tubes en verre, récipients, ustensiles en plastique) et réactifs (sérum, DMSO, par exemple) qu'on prévoit d'utiliser pendant l'essai, conformément au protocole (6), pour vérifier l'absence d'interférence avec les mesures.

### **Critères d'acceptabilité**

20. On détermine les activités agoniste et antagoniste du ou des produits chimiques d'essai en conduisant des épreuves (épreuve préliminaire et épreuve complète). Chaque épreuve comprend un maximum de 6 plaques microtitres. Chaque épreuve comprend aussi une série complète de dilutions du produit chimique de référence (C1 à C8), une concentration fixe d'un témoin positif, une concentration fixe d'un témoin négatif, un témoin solvant (et un témoin véhicule dans l'essai antagoniste) et un témoin de cytotoxicité positif. Les graphiques D.1 et D.2 indiquent la configuration des plaques pour les épreuves agoniste et antagoniste.

21. Pour la première plaque de chaque épreuve, on calcule ce qui suit.

- On effectue les mesures pour une série complète de dilutions du produit chimique de référence (DHT pour l'activité agoniste et flutamide pour l'activité antagoniste) (tableaux D.5 et D.6). Ces mesures doivent donner lieu à une courbe dose-réponse de forme sigmoïde. La CE<sub>50</sub> ou CI<sub>50</sub> qu'on déduit de la réponse de la série de dilutions du produit chimique de référence, et le CV des logCE<sub>50</sub> et logCI<sub>50</sub> de ce produit chimique de référence doivent satisfaire aux exigences énoncées dans le tableau D.3 (activité agoniste) ou le tableau D.4 (activité antagoniste).
- Les inductions relatives calculées pour le témoin positif et pour le témoin négatif doivent satisfaire aux exigences énoncées dans le tableau D.3 et le tableau D.4.

22. Pour chacune des plaques microtitres d'une série, on calcule ce qui suit.

- Pour l'ensemble des mesures, on calcule le coefficient multiplicateur d'induction du produit chimique de référence en divisant sa réponse moyenne, en unités relatives de lumière (URL), à la concentration la plus élevée (C8) par la réponse moyenne, en URL, du témoin solvant (TS). Ce coefficient multiplicateur d'induction doit satisfaire aux exigences minimales énoncées dans le tableau D.3 et le tableau D.4.
- Pour chaque plaque d'essai, on calcule le facteur Z en appliquant la formule ci-dessous. Ce facteur Z doit satisfaire aux exigences minimales relatives au facteur Z énoncées dans les tableaux D.3 et D.4.

$$\text{facteur } Z_{n^{\circ} \text{ plaque}} = 1 - 3 * \frac{(\text{réponse standard en URL } n^{\circ} \text{ plaque}[\text{TS}] + \text{réponse standard en URL } n^{\circ} \text{ plaque}[\text{C8 référence}])}{(|\text{réponse moyenne en URL } n^{\circ} \text{ plaque}[\text{TS}] - \text{réponse moyenne en URL } n^{\circ} \text{ plaque}[\text{C8 référence}]|)}$$

23. Une épreuve est considérée comme valide lorsqu'elle satisfait aux exigences énoncées dans les tableaux D.3 et D.4 et permet d'évaluer la réponse des produits chimiques d'essai.

24. Les critères d'acceptabilité s'appliquent aussi bien aux épreuves préliminaires qu'aux épreuves complètes.

Tableau D.1. Concentrations des étalons de référence dans l'essai agoniste

	Produit chimique	N° CAS	Plage d'essai (M) dans le puits
Produit chimique de référence	DHT	521-18-6	$1.0 \times 10^{-11} - 1.0 \times 10^{-07}$
Témoin positif (TP)	17 $\alpha$ -méthyltestostérone	58-18-4	$1.0 \times 10^{-07}$
Témoin négatif (TN)	Corticostérone	50-22-6	$1.0 \times 10^{-06}$

Tableau D.2. Concentrations des étalons de référence dans l'essai antagoniste

	Produit chimique	N° CAS	Plage d'essai (M) dans le puits
Produit chimique de référence	Flutamide (FLU)	13311-84-7	$1.0 \times 10^{-08} - 3.0 \times 10^{-05}$
Témoin positif (TP)	Linuron	330-55-2	$1.0 \times 10^{-05}$
Témoin négatif (TN)	Lévonorgestrel	797-63-7	$1.0 \times 10^{-06}$

Tableau D.3 : Critères d'acceptabilité dans le cadre des épreuves préliminaires et complètes (essai agoniste)

Numéro	Critères d'acceptabilité	
1	Courbe sigmoïde du produit chimique de référence (DHT)	oui
2	Plage de valeurs $CE_{50}$ du produit chimique de référence (DHT)	$1.0 \times 10^{-10} - 1.0 \times 10^{-09}$ M
3	CV  du $\log CE_{50}$ estimé du produit chimique de référence (DHT)	< 1.5 %
4	Induction relative (%) TP 17 $\alpha$ -méthyltestostérone	> 30 %
5	Induction relative (%) TN Corticostérone	< 10 %
6	Coefficient multiplicateur d'induction minimum à la concentration maximale de DHT (C8), par rapport au témoin solvant (TS) sur chaque plaque	> 20
7	Facteur Z calculé sur chaque plaque avec la concentration C8 de DHT et le TS	> 0.5



Tableau D.4. Critères d'acceptabilité dans le cadre des épreuves préliminaires et complètes (essai antagoniste)

Numéro	Critères d'acceptabilité	
1	Courbe sigmoïde du produit chimique de référence (flutamide)	oui
2	Plage de valeurs $CI_{50}$ du produit chimique de référence (flutamide)	$1.0 \times 10^{-10} - 1.0 \times 10^{-09}$ M
3	$ CV $ du $\log CI_{50}$ estimé du produit chimique de référence (flutamide)	< 3 %
4	Induction relative TP (linuron)	< 60 %
5	Induction relative TN (lévonorgestrel)	> 85 %
6	Coefficient multiplicateur d'induction minimum à la concentration maximale de flutamide (C8), par rapport au témoin solvant (TS) sur chaque plaque	> 10
7	Facteur Z calculé sur chaque plaque avec la concentration C8 de flutamide et le TS	> 0.5
8	$R^2$ entre $Y_c$ et $S_c^n$ pour le flutamide	$\leq 0.7$

### *Témoin solvant/véhicule et étalons de référence*

25. Il convient d'utiliser le même témoin solvant/véhicule et les mêmes étalons de référence (produits chimiques de référence, témoins positifs et négatifs) pour les épreuves préliminaires et pour les épreuves complètes. Les concentrations des étalons de référence doivent elles aussi être les mêmes.

### *Témoin solvant et témoin véhicule*

26. Le solvant utilisé pour dissoudre les produits chimiques d'essai doit pouvoir les dissoudre complètement et être miscible avec le milieu d'essai. L'eau, l'éthanol (pureté entre 95 % et 100 %) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) sont des solvants appropriés. Le DMSO (N° CAS 67-68-5) est le solvant à privilégier ; sa concentration maximale pendant l'incubation ne doit pas dépasser 0.1 % (v/v). Avant d'utiliser un autre solvant, il convient de démontrer que ce solvant ne provoque pas de cytotoxicité cellulaire ni d'interférence avec la performance de l'essai aux concentrations d'exposition qui simulent les conditions expérimentales.

27. Le solvant utilisé pour dissoudre les produits chimiques d'essai est également testé sans le produit chimique d'essai dissous (témoin solvant, TS).

28. Pour l'essai agoniste, le TS contient le milieu d'essai plus le solvant. Pour l'essai antagoniste, le TS contient le milieu d'essai plus le solvant et une concentration fixe du produit chimique de référence agoniste (DHT) (la concentration  $CE_{50}$ ). Le témoin véhicule (TV) contient quant à lui le milieu d'essai plus le solvant mais pas la concentration fixe du produit chimique de référence agoniste.

### *Produits chimiques de référence*

29. Le produit chimique de référence agoniste est la DHT ; il comprend une série de dilutions de huit concentrations (tableaux D.1 et D.5).

30. Le produit chimique de référence antagoniste est le flutamide (FLU) ; il comprend une série de dilutions de huit concentrations (tableaux D.2 et D.6). Chacune des concentrations du produit chimique de référence antagoniste est additionnée d'une concentration fixe du produit chimique de référence agoniste DHT (concentration  $CE_{50} = 3.0 \times 10^{-10}$  M), l'objectif étant de mesurer l'atténuation de la réponse agoniste.

31. Le produit chimique de référence antagoniste pour le contrôle de la spécificité est le flutamide (FLU) ; il comprend une série de dilutions de huit concentrations (tableaux D.2 et D.6). Chacune de ces concentrations est additionnée d'une concentration de DHT de 100X  $CE_{50}$ .

### *Témoin positif*

32. Le témoin positif pour les études d'activité agoniste est la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone (tableau D.1).

33. Le témoin positif pour les études d'activité antagoniste est le linuron (tableau D.2). Ce témoin est additionné d'une concentration fixe du produit chimique de référence agoniste DHT ( $3.0 \times 10^{-10}$  M).

### *Témoin négatif*

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

35. Le témoin négatif pour les études d'activité antagoniste est le lévonorgestrel (tableau D.2). Ce témoin est additionné d'une concentration fixe du produit chimique de référence agoniste DHT ( $3.0 \times 10^{-10}$  M).

### *Préparation des étalons de référence et des produits chimiques d'essai*

36. Les étalons de référence (produits chimiques de référence, témoins positifs, témoins négatifs) et les produits chimiques d'essai sont dissous dans 100 % de DMSO (ou tout autre solvant approprié). Il convient ensuite de préparer des dilutions (en série) appropriées d'étalons de référence et de produits chimiques d'essai dans ce même solvant. Avant leur dissolution, l'ensemble des produits chimiques est amené à température ambiante. Les solutions-mères fraîchement préparées d'étalons de référence et de produits chimiques d'essai ne doivent pas présenter de précipité ni de turbidité notables.

37. Les solutions-mères de produits chimiques de référence (DHT et FLU) peuvent être préparées en vrac et stockées sous forme d'aliquotes à une température de  $-20 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  pendant trois mois maximum. Une fois qu'une aliquote est décongelée, elle peut être stockée à  $-20 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  et réutilisée (décongélation/congélation) pendant trois semaines au maximum. Des solutions-mères de produits chimiques d'essai sont préparées extemporanément pour chaque expérience.

38. Il convient de préparer les dilutions finales des étalons de référence et des produits chimiques d'essai (c'est-à-dire les solutions de travail) extemporanément pour chaque expérience et de les utiliser dans les 24 heures suivant leur préparation.

### *Solubilité, cytotoxicité et détermination de l'ordre de grandeur*

39. Les produits chimiques d'essai sont évalués à une concentration maximale de 0.1 M (solution-mère). Lorsqu'il n'est pas possible de calculer la masse moléculaire d'un produit chimique d'essai, comme dans le cas des substances multiconstituants, des polymères, des mélanges, des UVCB, etc., il convient d'utiliser la méthode gravimétrique à partir de 50 mg/mL.

40. Le protocole de solubilité, tel qu'il est utilisé dans l'étude de validation, figure dans le document de référence (10). D'autres protocoles peuvent être utilisés à partir du moment où l'on a démontré qu'ils sont appropriés, par exemple en testant les produits chimiques d'épreuve de compétence. La solubilité des produits chimiques d'essai dans le solvant choisi est déterminée à partir d'une concentration de solution-mère de 0.1 M maximum. Si cette concentration pose des problèmes de solubilité, des concentrations plus faibles de solution-mère sont préparées jusqu'à ce que les produits chimiques d'essai soient entièrement solubilisés. La solubilité du produit chimique d'essai est ensuite évaluée dans le milieu d'essai aux concentrations d'exposition (la concentration d'exposition représente 0.1 % de la concentration de solution-mère, c'est-à-dire 0.1 mM).

41. Pendant l'épreuve préliminaire, des dilutions successives à 1:10 du produit chimique d'essai sont testées. Une gamme appropriée de concentrations affinées de produits chimiques d'essai est déduite des résultats de l'épreuve préliminaire, et ces concentrations sont à tester pendant l'épreuve complète. Le facteur de dilution (FD) à utiliser pour les épreuves complètes est le suivant : en cas de réponse positive ( $IR \geq 10\%$  pour l'activité agoniste ou  $IR \leq 80\%$  pour l'activité antagoniste), un FD 3/3.3 est appliqué en alternance ; si seule la concentration d'essai la plus élevée se situe au-dessus du seuil de 10 % (essai agoniste) ou en deçà du seuil de 80 % (essai antagoniste), le FD 2 est appliqué ; si aucune réponse n'est observée, le FD 5 est appliqué (voir les tableaux D.5 et D.6).

42. Les protocoles des méthodes d'essai agoniste et antagoniste prévoient des essais de cytotoxicité dans les épreuves préliminaires et les épreuves complètes. À l'issue de la phase d'exposition aux produits chimiques d'essai, on évalue la cytotoxicité lors des épreuves préliminaires par l'essai de perte de lactate déshydrogénase (LDH) et par une inspection visuelle qualitative (c'est-à-dire l'observation des cellules au microscope en vue de la détection de modifications morphologiques). L'inspection visuelle est considérée comme un outil d'évaluation important étant donné que l'essai de perte de LDH ne rend compte que de la mort cellulaire (lyse cellulaire). Dans les épreuves complètes, l'inspection visuelle qualitative est suffisante pour analyser la cytotoxicité. En ce qui concerne l'essai de perte de LDH, la concentration du produit chimique d'essai est considérée comme cytotoxique lorsque le pourcentage de perte de LDH est supérieur à 15 % par rapport au témoin de cytotoxicité positif (0.01 % de Triton X-100). D'autres essais de cytotoxicité peuvent être utilisés à partir du moment où l'on a démontré qu'ils sont appropriés, par exemple en testant les produits chimiques d'épreuve de compétence.

### ***Exposition aux produits chimiques d'essai et configuration de la plaque d'essai***

43. Après la trypsination d'un flacon de cellules cultivées confluentes, on met à nouveau les cellules en suspension dans le milieu d'essai à raison de  $1 \times 10^5$  cellules/mL. Ensuite, on dépose 100  $\mu$ L de ces cellules dans les puits B1-G11 d'une plaque microtitre 96 puits. Les puits restants sont remplis avec 200  $\mu$ L de tampon phosphate salin (PBS) (voir les graphiques D.1 et D.2). Les cellules déposées dans les puits sont pré-incubées pendant 24 heures  $\pm$  8 heures dans un incubateur au CO<sub>2</sub> (5 %  $\pm$  1 % de CO<sub>2</sub>) à 37 °C  $\pm$  1 °C, humidifiées.

44. Après la préincubation, l'état des cellules est vérifié visuellement [cytotoxicité, contamination et confluence (microscopie)]. Seules les plaques qui ne présentent aucune cytotoxicité ou contamination visuelle et qui ont une confluence minimale de 85 % dans une partie représentative de tous les puits sont utilisées pour les essais. Les cellules des puits B1-G11 sont exposées par l'ajout de 100  $\mu$ l de milieu d'essai contenant des séries de dilution appropriées des étalons de référence, des produits chimiques d'essai, des témoins contenant le solvant et des témoins de la cytotoxicité (tableau D.5 : essai agoniste ; tableau D.6 : essai antagoniste).

45. Les étalons de référence, les produits chimiques d'essai et les témoins contenant le solvant sont testés en triplicat, tandis que le témoin de cytotoxicité (Triton X-100) est testé dans six puits en réplicat. Le graphique D.1 présente l'agencement des plaques pour l'essai agoniste : il est identique dans les épreuves préliminaires et les épreuves complètes. Le graphique D.2 illustre l'agencement des plaques pour les épreuves préliminaires de l'essai antagoniste. Tous les puits exposés, à l'exception des puits témoins contenant le véhicule (TV), contiennent une concentration fixe de DHT, le produit chimique de référence agoniste [ $3.0 \times 10^{-10}$  M ( $CE_{50}$ )]. Le graphique D.3 illustre l'agencement des plaques pour les épreuves complètes de l'essai antagoniste, y compris le test de contrôle de la spécificité avec  $100 \times CE_{50}$  de DHT. Cela correspond à C(1-8)100 dans l'agencement des plaques.

46. Les plaques microtitres 96 puits sont incubées pendant encore 24 heures  $\pm$  2 heures dans un incubateur au  $CO_2$  (5 %  $\pm$  1 % de  $CO_2$ ) à  $37^\circ C \pm 1^\circ C$ , humidifiées. Après incubation, on examine visuellement les plaques pour vérifier l'absence d'une cytotoxicité et d'une contamination. Pour les épreuves préliminaires, 100  $\mu$ l du milieu d'exposition de chaque puits sont transférés sur une autre plaque qui sera utilisée pour le test de cytotoxicité (paragraphe 42). Les 100  $\mu$ l de milieu d'exposition qui restent dans le puits sont retirés, l'objectif étant d'exposer les cellules des puits au substrat de lyse (paragraphe 47) pour mesurer la luminescence.

**Graphique D.1. Agencement des plaques microtitres 96 puits pour les épreuves préliminaires et complètes destinées à l'évaluation des effets agonistes**

Plate 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Triton X-100	SC	C1 DHT	C2 DHT	C3 DHT	C4 DHT	C5 DHT	C6 DHT	C7 DHT	C8 DHT		PC
C	Triton X-100	SC	C1 DHT	C2 DHT	C3 DHT	C4 DHT	C5 DHT	C6 DHT	C7 DHT	C8 DHT		PC
D	Triton X-100	SC	C1 DHT	C2 DHT	C3 DHT	C4 DHT	C5 DHT	C6 DHT	C7 DHT	C8 DHT		PC
E	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8		NC
F	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8		NC
G	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8		NC
H												

Subsequent plates												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8		C8 DHT
C	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8		C8 DHT
D	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8		C8 DHT
E	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8		C8 DHT
F	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8		C8 DHT
G	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8		C8 DHT
H												

### Traduction :

Plate 1 : plaque n° 1

Subsequent plates : plaques suivantes

SC : TS

NC : TN

PC : TP

C(1-8) DHT = série de dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) du produit chimique de référence DHT.

C(1-8) = série de dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) du produit chimique d'essai.

TS = témoin avec solvant du produit chimique d'essai / des étalons de référence [même solvant que dans C(1-8)].

TP = témoin positif de la 17 $\alpha$ -méthyltestostérone

TN = témoin négatif de la corticostérone

Cellules grisées = puits externes, remplis de 200  $\mu$ L de PBS

Triton X-100 = témoin de cytotoxicité positif

Graphique D.2. Agencement des plaques microtitres 96 puits pour les épreuves préliminaires destinées à l'évaluation des effets antagonistes

Plate 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Triton X-100	SC	C1 FLU	C2 FLU	C3 FLU	C4 FLU	C5 FLU	C6 FLU	C7 FLU	C8 FLU	VC	
C	Triton X-100	SC	C1 FLU	C2 FLU	C3 FLU	C4 FLU	C5 FLU	C6 FLU	C7 FLU	C8 FLU	VC	
D	Triton X-100	SC	C1 FLU	C2 FLU	C3 FLU	C4 FLU	C5 FLU	C6 FLU	C7 FLU	C8 FLU	VC	
E	Triton X-100	NC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
F	Triton X-100	NC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
G	Triton X-100	NC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PC	
H												

Subsequent plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
C	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
D	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
E	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
F	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
G	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
H												

Plate 1 : plaque n° 1

Subsequent plates : plaques suivantes

SC : TS

NC : TN

PC : TP

VC : TV

C(1-8) FLU = série de dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) du produit chimique de référence flutamide (additionné de la concentration CE<sub>50</sub> de DHT)

C(1-8) = série de dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) du produit chimique d'essai (additionné de la concentration CE<sub>50</sub> de DHT)

TN = témoin négatif du lévonorgestrel (additionné de la concentration CE<sub>50</sub> de DHT)

TP = témoin positif du linuron (additionné de la concentration CE<sub>50</sub> de DHT)

TS = témoin avec solvant du produit chimique d'essai / des étalons de référence [même solvant que dans C(1-8)] (additionné de la concentration CE<sub>50</sub> de DHT)

TV = témoin véhicule (témoin avec solvant sans addition de DHT)

Cellules grisées = puits externes, remplis de 200 µL de PBS

Triton X-100 = témoin de cytotoxicité positif

Graphique D.3. Agencement des plaques microtitres 96 puits pour les épreuves complètes destinées à l'évaluation des effets antagonistes, avec contrôle de la spécificité

Plate 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Triton X-100	SC	C1 FLU	C2 FLU	C3 FLU	C4 FLU	C5 FLU	C6 FLU	C7 FLU	C8 FLU	VC	
C	Triton X-100	SC	C1 FLU	C2 FLU	C3 FLU	C4 FLU	C5 FLU	C6 FLU	C7 FLU	C8 FLU	VC	
D	Triton X-100	SC	C1 FLU	C2 FLU	C3 FLU	C4 FLU	C5 FLU	C6 FLU	C7 FLU	C8 FLU	VC	
E	Triton X-100	NC	C1 FLU 100	C2 FLU 100	C3 FLU 100	C4 FLU 100	C5 FLU 100	C6 FLU 100	C7 FLU 100	C8 FLU 100	PC	
F	Triton X-100	NC	C1 FLU 100	C2 FLU 100	C3 FLU 100	C4 FLU 100	C5 FLU 100	C6 FLU 100	C7 FLU 100	C8 FLU 100	PC	
G	Triton X-100	NC	C1 FLU 100	C2 FLU 100	C3 FLU 100	C4 FLU 100	C5 FLU 100	C6 FLU 100	C7 FLU 100	C8 FLU 100	PC	
H												

Subsequent plates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
C	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
D	Triton X-100	SC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C8 FLU	
E	Triton X-100	SC	C1 100	C2 100	C3 100	C4 100	C5 100	C6 100	C7 100	C8 100	C8 FLU	
F	Triton X-100	SC	C1 100	C2 100	C3 100	C4 100	C5 100	C6 100	C7 100	C8 100	C8 FLU	
G	Triton X-100	SC	C1 100	C2 100	C3 100	C4 100	C5 100	C6 100	C7 100	C8 100	C8 FLU	
H												

Plate 1 : plaque n° 1

Subsequent plates : plaques suivantes

SC : TS

NC : TN

PC : TP

VC : TV

C(1-8) FLU = série de dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) du produit chimique de référence flutamide (additionné de la concentration CE<sub>50</sub> de DHT)

C(1-8) FLU 100 = série de dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) du produit chimique de référence flutamide (additionné de 100x la concentration CE<sub>50</sub> de DHT)

TN = témoin négatif du lévonorgestrel (additionné de la concentration CE<sub>50</sub> de DHT)

TP = témoin positif du linuron (additionné de la concentration CE<sub>50</sub> de DHT)

TS = témoin avec solvant du produit chimique d'essai / des étalons de référence [même solvant que dans C(1-8)] (additionné de la concentration CE<sub>50</sub> de DHT)

TV= témoin véhicule (témoin avec solvant sans addition de DHT)

C(1-8) = série de dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) du produit chimique d'essai (additionné de la concentration CE<sub>50</sub> de DHT)

C(1-8) 100 = série de dilutions (1-8, concentrations faibles à élevées) du produit chimique d'essai (additionné de 100x la concentration CE<sub>50</sub> de DHT) (contrôle de la spécificité)

Cellules grisées = puits externes, remplis de 200 µL de PBS

Triton X-100 = témoin de cytotoxicité positif

### Mesure de la luminescence

47. Il existe plusieurs façons de mesurer la luminescence. Les méthodes utilisées lors de la validation de la méthode d'essai AR-CALUX® comprenaient soit l'utilisation d'un kit commercial de luminescence *flash* (réaction rapide) ou *glow* (réaction lente), soit la préparation du substrat de luminescence en interne. Dans tous les cas, le milieu des puits est retiré, et les cellules sont lysées après 24 heures ± 2 heures d'incubation aux fins de mesure de l'activité de la luciférase.

48. Pour mesurer la luminescence, un luminomètre est nécessaire. En cas d'utilisation de plaques transparentes, le luminomètre doit être équipé de deux injecteurs. La réaction de la luciférase est déclenchée par injection de la luciférine (substrat de la luciférase). La réaction est arrêtée par l'ajout d'un

solvant approprié (0.2 M de NaOH ou 25 % v/v d'acide acétique selon le luminomètre, par exemple), l'objectif étant d'éviter le transfert de luminescence d'un puits à l'autre. En cas d'utilisation d'un kit commercial, les instructions spécifiques fournies avec le kit doivent être suivies. Les plaques blanches permettent l'utilisation d'un luminomètre sans injecteur ou avec un injecteur selon le kit.

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

### ***Épreuve préliminaire dans les essais (ant)agonistes***

50. Les résultats d'analyse de l'épreuve préliminaire servent à déterminer une gamme plus précise de concentrations de produits chimiques d'essai pour l'épreuve complète. L'évaluation des résultats d'analyse de l'épreuve préliminaire et la détermination de la gamme affinée de concentrations de produits chimiques d'essai destinée à l'épreuve complète sont décrites en détail dans le protocole de la méthode d'essai agoniste et antagoniste (6). Les paragraphes suivants en résument succinctement les grandes étapes. Voir les tableaux D.5 et D.6 pour des conseils sur l'élaboration de la série de dilutions.

51. Pendant l'épreuve préliminaire, les produits chimiques d'essai sont testés à l'aide de la série de dilutions indiquée dans le tableau D.5 (activité agoniste) ou le tableau D.6 (activité antagoniste). Il convient de tester toutes les concentrations dans des puits tripliqués selon l'agencement des plaques indiqué sur le graphique D.1 (activité agoniste) ou sur le graphique D.2 (activité antagoniste).

52. Une épreuve préliminaire est toujours suivie d'une épreuve complète, que la réponse observée lors de l'épreuve préliminaire soit positive ou négative. Une épreuve complète suffit pour tirer une conclusion conformément aux critères de décision répertoriés dans le tableau D.7.



### *Sélection des concentrations pour l'évaluation des effets (ant)agonistes*

53. Seuls les résultats qui satisfont aux critères d'acceptabilité (tableaux D.3 et D.4) sont considérés comme valides et permettent d'évaluer la réponse aux produits chimiques d'essai. Si une ou plusieurs plaques microtitres d'une épreuve ne satisfont pas aux critères d'acceptabilité, il convient de tester de nouveau les plaques microtitres correspondantes. Si la première plaque contenant la série complète de dilutions du produit chimique de référence ne satisfait pas aux critères d'acceptabilité, une épreuve complète (six plaques) est réalisée de nouveau.

54. On détermine la concentration (la plus faible) à laquelle on observe une induction (activité agoniste) ou une inhibition (activité antagoniste) maximale sans cytotoxicité. Il convient que la plus forte concentration du produit chimique d'essai dans le cadre de l'épreuve complète soit trois fois supérieure à cette concentration déterminée, ou une concentration d'exposition maximale de 0.1 mM ou 50 µg/mL pour les produits chimiques dont on ne connaît pas la concentration molaire.

55. On prépare une série complète de dilutions affinées du produit d'essai suivant les étapes de dilution indiquées dans les tableaux D.5 et D.6, en commençant par la plus forte concentration, déterminée ci-dessus.

56. Pour soumettre à l'épreuve complète un produit chimique d'essai sans effet (ant)agoniste déjà observé, on commence par la plus forte concentration non cytotoxique identifiée lors de l'épreuve préliminaire et on suit les étapes de dilution indiquées dans les tableaux D.5 et D.6.

### *Épreuve complète dans l'essai agoniste*

57. Après avoir déterminé les gammes affinées de concentrations, on teste les produits chimiques de manière exhaustive grâce à la série de dilutions indiquée dans le tableau D.5 (activité agoniste). Toutes les concentrations sont testées dans des puits tripliqués selon l'agencement des plaques indiqué sur le graphique D.1 (activité agoniste) (voir le paragraphe 45).

58. Seuls les résultats qui satisfont aux critères d'acceptabilité (tableau D.3) sont considérés comme valides et permettent d'évaluer la réponse aux produits chimiques d'essai. Si une ou plusieurs des plaques microtitres utilisées dans une épreuve ne satisfont pas aux critères d'acceptabilité, les produits chimiques testés dans ces plaques sont testés de nouveau dans le cadre d'une épreuve répétée. Si la première plaque contenant la série complète de dilutions du produit chimique de référence ne satisfait pas aux critères d'acceptabilité, une épreuve complète (six plaques) est réalisée de nouveau.

### *Épreuve complète et contrôle de la spécificité dans l'essai antagoniste*

59. Après avoir déterminé les gammes affinées de concentrations, on soumet simultanément les produits chimiques d'essai à une épreuve complète et à un contrôle de la spécificité (sur la même plaque), grâce à la série de dilutions indiquée dans le tableau D.6 (activité antagoniste) (voir le paragraphe 45). Toutes les concentrations sont testées dans des puits tripliqués selon l'agencement des plaques indiqué sur le graphique D.3 (activité antagoniste).

60. Seuls les résultats qui satisfont aux critères d'acceptabilité (tableau D.4) sont considérés comme valides et permettent d'évaluer la réponse des produits chimiques d'essai. Si une ou plusieurs des plaques microtitres utilisées dans une série d'analyse ne remplissent pas les critères d'acceptation, il convient de tester de nouveau les plaques microtitres correspondantes. Si la première plaque contenant la série complète de dilutions de produits chimiques de référence ne satisfait pas aux critères d'acceptabilité, une épreuve complète (six plaques) est réalisée de nouveau.

Tableau D.5. Concentrations et dilutions des étalons de référence et produits chimiques d'essai utilisés dans l'essai agoniste

Étalon de référence (DHT)	Témoins		Produit chimique d'essai	Épreuve préliminaire	Épreuve complète			
	conc. (M) dans le puits				FD 10	FD 5	FD 3/ 3.33	FD 2
C1	1.0 x 10 <sup>-11</sup>	TP	1.0 x 10 <sup>-07</sup>	C1	10 000 000 x	78125 x	3 000 x	128 x
C2	3.0 x 10 <sup>-11</sup>	TN	1.0 x 10 <sup>-06</sup>	C2	1 000 000 x	15625 x	1 000 x	64 x
C3	1.0 x 10 <sup>-10</sup>	TS	0	C3	100 000 x	3125 x	300 x	32 x
C4	3.0 x 10 <sup>-10</sup>			C4	10 000 x	625 x	100 x	16 x
C5	1.0 x 10 <sup>-09</sup>			C5	1 000 x	125 x	30 x	8 x
C6	3.0 x 10 <sup>-09</sup>			C6	100 x	25 x	10 x	4 x
C7	1.0 x 10 <sup>-08</sup>			C7	10 x	5 x	3 x	2 x
C8	1.0 x *10 <sup>-07</sup>			C8	1 x	1 x	1 x	1 x

TP - témoin positif (17 $\alpha$ -méthyltestostérone)

TN - témoin négatif (corticostérone)

TS - témoin avec solvant du produit chimique d'essai

Tableau D.6. Concentrations et dilutions des étalons de référence et produits chimiques d'essai utilisés dans l'essai antagoniste

Étalon de référence (flutamide)		Témoins		Produit chimique d'essai	Épreuve préliminaire	Épreuve complète		
conc. (M) dans le puits		conc. (M) dans le puits				FD 10	FD 5	FD 3/3.33
C1	1.0 x 10 <sup>-08</sup>	TP	1.0 x 10 <sup>-05</sup>	C1	10 000 000 x	78125 x	3 000 x	128 x
C2	3.0 x 10 <sup>-08</sup>	TN	1.0 x 10 <sup>-06</sup>	C2	1 000 000 x	15625 x	1 000 x	64 x
C3	1.0 x 10 <sup>-07</sup>	TS	0	C3	100 000 x	3125 x	300 x	32 x
C4	3.0 x 10 <sup>-07</sup>	TV	0	C4	10 000 x	625 x	100 x	16 x
C5	1.0 x 10 <sup>-06</sup>			C5	1 000 x	125 x	30 x	8 x
C6	3.0 x 10 <sup>-06</sup>			C6	100 x	25 x	10 x	4 x
C7	1.0 x 10 <sup>-05</sup>			C7	10 x	5 x	3 x	2 x
C8	3.0 x 10 <sup>-05</sup>			C8	1 x	1 x	1 x	1 x
		<b>Ajout d'une concentration de produit agoniste (M dans le puits)</b>						
		DHT 3.0 x 10 <sup>-10</sup> (=CE <sub>50</sub> )						
		<b>Ajout d'une concentration de produit agoniste</b>						
		<b>Contrôle de la spécificité (M dans le puits)</b>						
		DHT 3.0 x 10 <sup>-8</sup> (=100x CE <sub>50</sub> )						

TP – témoin positif (linuron)

TN - témoin négatif (lévonorgestrel)

TS - témoin solvant

TV - témoin véhicule (ne contient pas de concentration fixe du produit chimique de référence agoniste)

## Analyse de données

### Normalisation des données

61. Les données brutes obtenues grâce au luminomètre sont exprimées en URL. Lorsque les critères d'acceptabilité sont satisfaits, comme indiqué dans les tableaux D.3 et D.4, les étapes de calcul ci-après sont effectuées en vue de la détermination des paramètres requis. Les données brutes sont transférées dans une feuille d'analyse des données conçue pour les épreuves préalables ou les épreuves complètes.

#### Dans l'essai agoniste :

62. Pour chaque produit chimique d'essai et pour le produit chimique de référence DHT, calculer :

- l'induction relative à la concentration  $c$ , dans le réplicat technique  $i$ , ( $Y_{ic}$ ) comme suit :

$$Y_{ic} = \frac{\text{URL du produit chimique d'essai (réplicat } i) - \text{moyenne des URL du TS}}{\text{moyenne des URL de DHT}_{C8} - \text{moyenne des URL du TS}} \times 100, \quad i = 1,2,3$$

- la moyenne des inductions relatives des trois réplicats techniques ( $Y_c$ ),

$$Y_c = \text{moyenne des } Y_{ic}$$

#### Dans l'essai antagoniste :

63. Pour chaque produit chimique d'essai et le produit chimique de référence FLU, calculer :

- l'induction relative à la concentration  $c$ , dans le réplicat technique  $i$ , ( $Y_{ic}$ ) comme suit :

$$Y_{ic} = \frac{\text{URL du produit chimique d'essai (réplicat } i) - \text{moyenne des URL de FLU}_{c8}}{\text{moyenne des URL du TS} - \text{moyenne des URL de FLU}_{c8}} \times 100, \quad i = 1, 2, 3$$

- la moyenne des inductions relatives sur les trois réplicats techniques ( $Y_c$ )

$$Y_c = \text{moyenne des } Y_{ic}$$

Note : Dans l'essai antagoniste, le témoin solvant (TS) est le milieu d'essai additionné de la concentration  $CE_{50}$  de DHT.

#### *Dans le test de contrôle de la spécificité*

- Pour calculer  $S_{ic}$ , la réponse de contrôle de la spécificité du produit chimique d'essai à la concentration  $c$  dans le réplicat  $i$ , appliquer la même formule que celle indiquée ci-dessus pour l'essai antagoniste, mais les URL du produit chimique d'essai (réplicats  $i$ ) doivent être celles obtenues dans le test de contrôle de la spécificité (ajout de  $100 \times CE_{50}$  de DHT).
- En outre, calculer la réponse normalisée de contrôle de la spécificité du produit chimique d'essai ( $S_c^n$ ) en fixant la concentration  $C_1$  de la réponse de contrôle de la spécificité du produit chimique d'essai ( $S_c$ ) à 100 % comme suit :

$$S_c^n = 100 \times \frac{S_c}{S_{c_1}}, \quad c = c_1, \dots, c_8$$

#### **Cytotoxicité**

64. Pour toutes les concentrations de produit chimique d'essai évaluées lors de l'analyse préliminaire, calculer le pourcentage de perte de LDH par rapport au témoin de cytotoxicité positif (0.01 % de Triton X-100) (pourcentage fixé à 100 %) comme suit :

$$\% \text{ de perte de LDH} = \frac{\text{Moyenne des UA prod. chim. d'essai} - \text{Moyenne des UA TS}}{\text{Moyenne des UA TP} - \text{Moyenne des UA TS}} \times 100$$

Note : UA= unité d'absorption

65. En outre, les cellules doivent faire l'objet d'une inspection visuelle qualitative après exposition aux produits chimiques d'essai. Le produit chimique d'essai est considéré comme cytotoxique à une concentration spécifique lorsque l'une ou l'autre des deux conditions suivantes est remplie :

- le pourcentage moyen de perte de LDH de l'échantillon tripliqué est supérieur à 15 % par rapport au témoin positif, ou bien
- une cytotoxicité est observée au microscope.

**Calcul des paramètres**

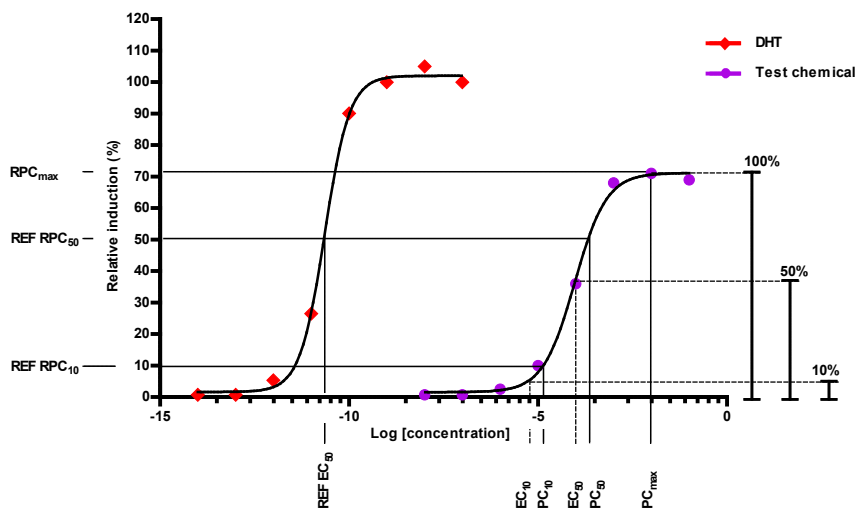
66. Après la normalisation des données, appliquer une régression non linéaire (pente variable, 4 paramètres) à  $Y_{ic}$  à l'aide de la formule suivante :

$$y = \frac{(Sommet - Base)}{[1 + 10^{((\log CE_{50} - x) \times Pente\ de\ Hill)}]}$$

- x= log de la dose ou concentration
- y= réponse [induction relative (%)]
- Sommet = induction maximale (%)
- Base = induction minimale (%)
- LogCE<sub>50</sub> = log de la concentration à laquelle on observe 50 % de la réponse maximale
- Pente de Hill = pente de la courbe de Hill

67. Dans le cadre de l'essai agoniste, déterminer la CE<sub>10</sub> et la CE<sub>50</sub> du produit chimique de référence ainsi que la CE<sub>10</sub>, la CE<sub>50</sub>, la TP<sub>10</sub> et la TP<sub>50</sub> des produits chimiques d'essai. Dans le cadre de l'essai antagoniste, déterminer la CI<sub>50</sub> et la CI<sub>20</sub> du produit chimique de référence ainsi que la CI<sub>20</sub>, la CI<sub>50</sub>, la TP<sub>80</sub> et la TP<sub>50</sub> des produits chimiques d'essai. Pour mieux caractériser la réponse d'un produit chimique d'essai, il convient d'indiquer l'ampleur de l'effet (essai agoniste : RTP<sub>max</sub> ; essai antagoniste : RTP<sub>min</sub>) et la concentration à laquelle l'effet se produit (essai agoniste : TP<sub>max</sub> ; essai antagoniste : TP<sub>min</sub>). Les graphiques D.4 (essai agoniste) et D.5 (essai antagoniste) représentent ces paramètres.

**Graphique D.4. Vue d'ensemble des paramètres déterminés pour un produit chimique d'essai dans l'essai agoniste**



- Relative induction (%) = Induction relative (%)
- Log (concentration) = Log (concentration)
- RPC<sub>max</sub> = RTP<sub>max</sub>
- REF RPC<sub>50</sub> = RTP<sub>50</sub> REF
- REF RPC<sub>10</sub> = RTP<sub>10</sub> REF
- REF EC<sub>50</sub> = CE<sub>50</sub> REF
- EC<sub>10</sub> = CE<sub>10</sub>
- PC<sub>10</sub> = TP<sub>10</sub>
- EC<sub>50</sub> = CE<sub>50</sub>
- PC<sub>50</sub> = TP<sub>50</sub>
- PC<sub>max</sub> = TP<sub>max</sub>

Test chemical = Produit chimique d'essai

$CE_{10}$  = concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle on observe 10 % de sa réponse maximale

$CE_{50}$  = concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle on observe 50 % de sa réponse maximale

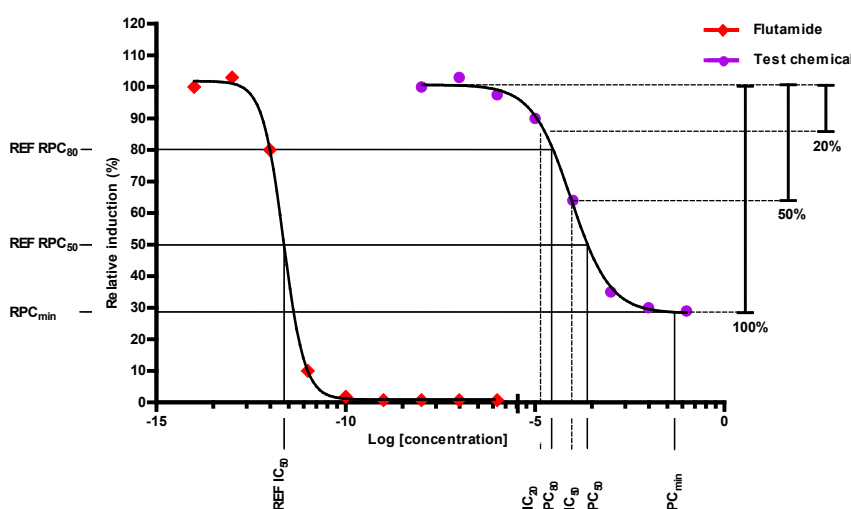
$TP_{10}$  = concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle sa réponse est égale à celle de la  $CE_{10}$  du produit chimique de référence (RTP<sub>10</sub> REF)

$TP_{50}$  = concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle sa réponse est égale à celle de la  $CE_{50}$  du produit chimique de référence (RTP<sub>50</sub> REF)

$TP_{max}$  = concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle la réponse est maximale (RTP<sub>max</sub>)

$CE_{50}$  REF = concentration du produit chimique de référence DHT à laquelle on observe 50 % de sa réponse maximale

**Graphique D.5. Vue d'ensemble des paramètres déterminés pour un produit chimique d'essai dans l'essai antagoniste**



Relative induction (%) = Induction relative (%)

Log (concentration) = Log (concentration)

REF RPC<sub>80</sub> = RTP<sub>80</sub> REF

REF RPC<sub>50</sub> = RTP<sub>50</sub> REF

REF RPC<sub>min</sub> = RTP<sub>min</sub> REF

REF IC<sub>50</sub> = CI<sub>50</sub> REF

IC<sub>20</sub> = CI<sub>20</sub>

PC<sub>80</sub> = TP<sub>80</sub>

IC<sub>50</sub> = CI<sub>50</sub>

PC<sub>50</sub> = TP<sub>50</sub>

PC<sub>min</sub> = TP<sub>min</sub>

Test chemical = Produit chimique d'essai

CI<sub>20</sub> = concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle on observe 80 % de sa réponse maximale (20 % d'inhibition)

CI<sub>50</sub> = concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle on observe 50 % de sa réponse maximale (50 % d'inhibition)

TP<sub>80</sub> = concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle sa réponse est égale à celle de la CI<sub>20</sub> du produit chimique de référence (RTP<sub>80</sub> REF)

TP<sub>50</sub> = concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle sa réponse est égale à celle de la CI<sub>50</sub> du produit chimique de référence (RTP<sub>50</sub> REF)

TP<sub>min</sub> = concentration d'un produit chimique d'essai à laquelle la réponse est minimale (RTP<sub>min</sub>)

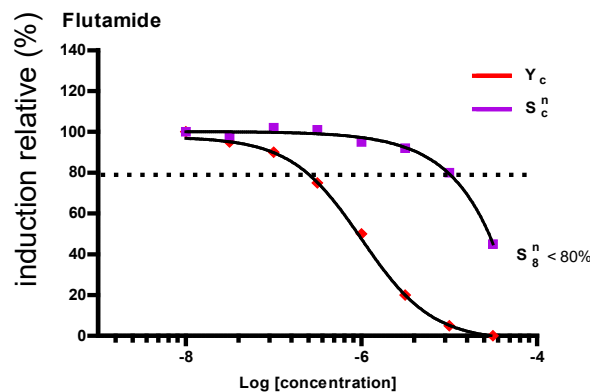
CI<sub>50</sub> REF = concentration du produit chimique de référence à laquelle on observe 50 % de sa réponse maximale

68. En ce qui concerne les produits chimiques d'essai, il n'est pas toujours possible d'obtenir une courbe dose-réponse complète en raison de problèmes de cytotoxicité ou de solubilité, par exemple. Dans ces cas, la  $CE_{50}$  et la  $CE_{10}$  ne peuvent pas être déterminées dans l'essai agoniste, et la  $CI_{50}$  et la  $CI_{20}$  ne

peuvent pas être déterminées dans l'essai antagoniste. Il suffit donc alors de déterminer, si possible, la  $TP_{10}$ , la  $TP_{50}$  et la  $TP_{max}$  (essai agoniste) ainsi que la  $TP_{80}$ , la  $TP_{50}$  et la  $TP_{min}$  (essai antagoniste), des valeurs qui peuvent être obtenues, par exemple, par interpolation linéaire entre les deux points de données les plus proches.

69. La spécificité d'une réponse antagoniste (c'est-à-dire le fait d'être un véritable antagoniste compétitif) est déterminée d'après les critères d'interprétation des données (tableau D.7). Lors de l'interprétation des résultats du contrôle de la spécificité, les deux courbes dose-réponse ( $Y_c$  et  $S_c^n$ ) font l'objet d'une inspection visuelle, et l'on vérifie si le premier critère positif de l'essai antagoniste est applicable (voir le tableau D.7 :  $S_c^n > 80\%$  à toutes les concentrations). Sinon, on calcule le carré  $R^2$  du coefficient de corrélation entre l'induction relative de la réponse standard ( $Y_c$ ) et l'induction relative de la réponse normalisée ( $S_c^n$ ) du produit chimique d'essai, et on vérifie ce deuxième critère positif de l'essai antagoniste (voir le tableau D.7 :  $R^2 \leq 0.9$ ). Mais la prudence s'impose, car ce critère ne permet pas de conclure à 100 % [comme le montre l'étude de validation de la méthode d'essai AR-CALUX® (5)]. En effet, la forme des courbes et les valeurs aberrantes peuvent avoir eu une influence. Le recours à un jugement d'expert peut se révéler nécessaire.

**Graphique D.6. Représentation de l'induction relative de la réponse standard ( $Y_c$ ) et de l'induction relative de la réponse normalisée ( $S_c^n$ ) d'un véritable antagoniste compétitif ( $R^2 \leq 0.9$ )**



Critères d'interprétation des données

70. Pour interpréter les données et décider si un produit chimique d'essai est considéré comme positif ou négatif, on utilise les critères du tableau D.7. Une épreuve complète suffit pour tirer une conclusion.

Tableau D.7. Critères de décision

<b>AGONISTE</b>	
<b>Positif</b>	lorsque l'induction relative ( $Y_c$ ) du produit chimique d'essai est $\geq 10\%$ (RTP <sub>10</sub> REF) pour deux concentrations consécutives ou plus.
<b>Négatif</b>	dans tous les autres cas
<b>ANTAGONISTE</b>	
<b>Positif</b>	lorsque l'induction relative ( $Y_c$ ) du produit chimique d'essai est $\leq 80\%$ (RTP <sub>80</sub> REF) pour deux concentrations consécutives ou plus et soit la condition suivante est remplie : <ul style="list-style-type: none"> <li>l'induction relative de la réponse normalisée de contrôle de la spécificité du produit chimique d'essai <math>s_c^n</math> est <math>&gt; 80\%</math> à toutes les concentrations</li> </ul> soit les deux conditions suivantes sont remplies : <ul style="list-style-type: none"> <li>l'induction relative de la réponse normalisée de contrôle de la spécificité du produit chimique d'essai à la concentration la plus élevée <math>s_{c_8}^n</math> est <math>\leq 80\%</math></li> <li>le carré <math>R^2</math> du coefficient de corrélation entre l'induction relative de la réponse normalisée de contrôle de la spécificité du produit chimique d'essai (<math>s_c^n</math>) et l'induction relative de la réponse standard (<math>Y_c</math>) est <math>\leq 0.9</math></li> </ul>
<b>Négatif</b>	dans tous les autres cas

71. Les critères indiqués dans le tableau D.7 ne sont appliqués qu'aux données générées en l'absence de cytotoxicité.

72. Outre la catégorisation dichotomique (tableau D.7), les mesures de la réponse peuvent également être utilisées dans le cadre d'approches intégrées.



## Bibliographie

1. Sonneveld, E., Jansen, H.J., Riteco, J.A., Brouwer, A, van der Burg B. (2004). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol. Sci.* 83(1), 136-148.
2. Thorne, N., Inglese, J. and Auld, D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biolog. *Chemistry and Biology* 17(6), 646-57.
3. van Vugt-Lussenburg, B.M.A., van der Lee, R.B., Man, H.Y., Middelhof, I., Brouwer, A., Besselink, H., van der Burg, B. (2018) Incorporation of metabolic enzymes to improve predictivity of reporter gene assay results for estrogenic and anti-androgenic activity. *Reprod Toxicol* 75, 40-48
4. Van der Burg, B., Pieterse, B., Buist, H., Lewin, G., van der Linden, S.C., Man, H.Y., Rorije, E., Piersma, A.H., Mangelsdorf, I., Wolterbeek, A.P., Kroese, E.D., van Vugt-Lussemburg, B. (2015a). A high throughput screening system for predicting chemically-induced reproductive organ deformities. *Reprod. Toxicol.* 55, 95-103.
5. Validation Study Report on the Performance assessment of the AR-CALUX® *in vitro* method (2019). Available at ( <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2010-07>)
6. Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)androgenic potential using AR-CALUX® cells (2019). Available at ( <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2010-07>)
7. Kleinstreuer, N.C., Ceger, P., Watt, E.D., Martin, M., Houck, K., Browne, P., Thomas, R.S., Casey, W.M., Dix, D.J., Allen, D., Sakamuru, S., Xia, M., Huang, R., Judson, R. (2017), Development and Validation of a Computational Model for Androgen Receptor Activity. *Chem Res Toxicol.*, 30(4):946-964
8. Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M. and Ishii, H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.
9. Eldering, J.A., Felten, C., Veilleux, C.A. & Potts, B.J. Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. *Biologicals* 32, 183-93 (2004).
10. Solubility Determination by Visual Inspection (2019). Available at ( <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/test-method/tm2010-07>)

## Annex E. (méthode 3) Essai de transactivation médiée par les récepteurs des androgènes visant la détection de l'activité androgénique agoniste et antagoniste des produits chimiques et utilisant la lignée cellulaire humaine 22Rv1/MMTV\_GR-KO obtenue par transfection stable

### Remarques préliminaires et limites

1. Il convient de lire la section « Introduction générale » avant d'utiliser cette méthode d'essai (corps du texte, pages 6-9).
2. L'essai d'activation transcriptionnelle médiée par les récepteurs des androgènes (AR) et utilisant la lignée cellulaire 22Rv1/MMTV\_GR-KO obtenue par transfection stable a été mis au point pour la détection de l'activité endocrinienne des produits chimiques via l'interaction avec l'AR d'une lignée de cellules humaines du cancer de la prostate (22Rv1) qui exprime l'AR de manière endogène (1, 2). Cette méthode d'essai est conçue spécifiquement pour détecter l'activation et l'inhibition transcriptionnelles médiées par l'AR humain, avec l'activité de la luciférase comme effet mesuré. Les cas d'interférence du produit chimique avec les signaux de luminescence sont limités dans une lignée cellulaire 22Rv1/MMTV avec inactivation du GR.
3. L'AR tronqué à activité constitutive est exprimée dans les cellules 22Rv1/MMTV mais n'a pas d'influence significative. Cela est vérifié que le niveau du témoin solvant (niveau basal) n'est pas élevé, que le coefficient multiplicateur d'induction augmente en fonction de la dose quand on ajoute de la DHT, et que le niveau d'augmentation est très élevé par rapport à ceux d'autres essais effectués avec des gènes rapporteurs (2)(4). En outre, l'AR complet est exprimé à un niveau comparable à celui qu'on observe avec la cellule LNCaP (2).
4. Le récepteur des glucocorticoïdes (GR) est exprimé dans les cellules d'origine 22Rv1 aux côtés de l'AR, de manière endogène. La réponse minimale médiée par le GR peut interférer avec la réponse médiée par l'AR, car le GR, structurellement similaire à l'AR, partage des éléments de réponse hormonale qui présentent une interférence avec lui (1, 3, 5). Pour éliminer l'expression du GR dans les cellules, on a élaboré une lignée cellulaire 22Rv1/MMTV avec inactivation du GR (*GR Knock-Out* : GR-KO) grâce au système CRISPR-Cas9 (1, 2, 5).
5. La lignée cellulaire 22Rv1/MMTV\_GR-KO a montré une faible activité métabolique dans l'étude de validation (6). La validation a été réalisée uniquement avec des substances monoconstituants. Cette méthode d'essai peut théoriquement être appliquée à des mélanges. Mais, avant de l'appliquer à des mélanges, il convient d'examiner si les résultats seront scientifiquement significatifs.
6. Les définitions et abréviations utilisées dans cette Ligne directrice pour les essais sont fournies à l'annexe A de la présente LD.

7. La méthode d'essai 22Rv1/MMTV\_GR-KO a été validée par l'Institut national d'évaluation de la sécurité des aliments et des médicaments (*National Institute for Food and Drug Safety Evaluation – NIFDS*), l'Institut coréen d'essai et de recherche (*Korea Testing and Research Institute – KTR*) et l'université de Dongguk, avec l'aide d'une équipe de gestion d'étude composée de membres du groupe de l'OCDE chargé de la gestion de la validation des essais n'ayant pas recours à des animaux. Elle est utilisée pour la détection des agonistes et antagonistes de l'AR de niveau 2 dans le Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (6, 7, 8). L'étude de validation a été menée conformément au document-guide n° 34 de l'OCDE. La pertinence et la fiabilité de l'essai par rapport à l'objectif visé ont été démontrées (9, 10).

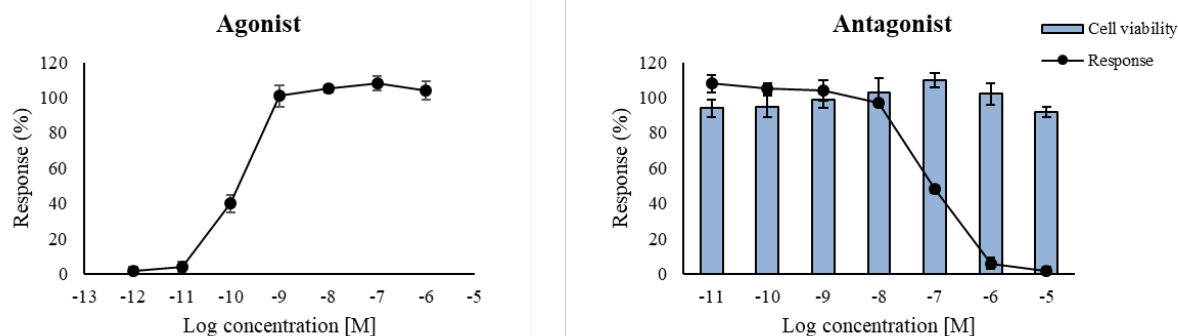
### Principe de la méthode d'essai

8. Le système d'essai fourni dans cette méthode utilise la lignée cellulaire 22Rv1/MMTV\_GR-KO, qui est dérivée d'une lignée cellulaire 22Rv1. L'ATCC a classé les cellules 22Rv1 au niveau de sécurité biologique 2, car elles produisent le rétrovirus humain XMRV (virus apparenté au virus de la leucémie murine xénotrope) (11). Lors de la réalisation de l'expérience avec la lignée cellulaire 22Rv1, il convient de prendre en compte la sécurité biologique. La lignée cellulaire élaborée est composée de cellules 22Rv1 obtenues par transfection stable du vecteur pGL4[*luc2P/MMTV/Hygro*]. Le protocole du vecteur pGL4[*luc2P/MMTV/Hygro*] est protégé par une licence d'utilisation limitée Promega exigeant i) d'utiliser des réactifs d'essai de luminescence commercialisés par Promega, ou ii) de contacter Promega afin d'obtenir une licence libre pour une utilisation commerciale.

9. Les essais (ant)agonistes de l'AR utilisant la lignée cellulaire 22Rv1/MMTV\_GR-KO sont réalisés selon une approche progressive. Après la réalisation d'une épreuve préliminaire, une épreuve complète et un contrôle de la spécificité (uniquement pour l'essai antagoniste de l'AR) sont effectués. Mais l'épreuve complète n'est effectuée que si l'épreuve préliminaire indique une activité positive (agoniste ou antagoniste). L'épreuve préliminaire sert aussi à déterminer la concentration de produit chimique d'essai utilisée au démarrage de l'épreuve complète. Pour confirmer, le cas échéant, que le produit chimique d'essai est un véritable antagoniste compétitif de l'AR, on teste aussi la spécificité (voir le paragraphe 28).

10. L'interprétation des données en ce qui concerne l'effet agoniste de l'AR dépend de la réponse maximale provoquée par le produit chimique d'essai. Si cette réponse est supérieure ou égale à 10 % de celle provoquée par 10 nM de 5 $\alpha$ -DHT, le témoin agoniste de l'AR (TP<sub>AGO</sub>), le produit chimique d'essai est considéré comme un agoniste de l'AR. L'interprétation des données en ce qui concerne l'effet antagoniste de l'AR se fait en fonction de deux critères : i) une inhibition d'au moins 30 % de la réponse obtenue avec 800 pM de DHT et ii) une valeur R<sup>2</sup> inférieure à 0.9 avec le contrôle de la spécificité (voir les paragraphes 40 et 43). Si ces deux critères sont remplis, le produit chimique est considéré comme un véritable antagoniste de l'AR. L'analyse des données est développée plus en détail aux paragraphes 37 à 41. Le graphique E.1 illustre les courbes concentration-réponse types des produits chimiques de référence agonistes et antagonistes (DHT et bicalutamide).

Graphique E.1. Réponses types des témoins positifs lors de l'épreuve préliminaire (essais agoniste et antagoniste)



Response (%) : réponse (%)

Agoniste : agoniste

Antagonist : antagoniste

Log concentration [M] : Log concentration [M]

Cell viability : viabilité cellulaire

## Démonstration des compétences du laboratoire

11. Chaque laboratoire démontre sa compétence quant à l'utilisation de la méthode d'essai 22Rv1/MMTV\_GR-KO. Les produits chimiques d'épreuve de compétence à utiliser pour les essais agoniste et antagoniste sont énumérés dans les tableaux B.4a et B.4b de l'annexe B de la présente Ligne directrice. Les produits chimiques sont testés au moins deux fois, à des jours différents, et les résultats doivent concorder avec les classements et les valeurs des tableaux B.4a et B.4b de l'annexe B.

## Procédure

### Lignée cellulaire

12. La lignée cellulaire 22Rv1/MMTV\_GR-KO est une lignée cellulaire issue d'une transfection stable, sensible aux androgènes, dérivée de cellules humaines du cancer de la prostate (22Rv1), qui sont adhérentes et induisent une réponse positive de l'AR. Cette lignée cellulaire peut être obtenue auprès de « Korean Collection for Type Cultures » (« KCTC »)<sup>1</sup>, après signature d'un accord de transfert de matériel.

13. Il convient de n'utiliser avec cette méthode que des cultures de cellules exemptes de mycoplasmes. Avant de commencer toute expérience, vérifier l'absence d'infection mycoplasmaïque en appliquant une méthode ayant une bonne sensibilité, telle que l'analyse PCR (12).

### Stabilité de la lignée cellulaire

<sup>1</sup> La lignée cellulaire 22Rv1/MMTV\_GR-KO peut être obtenue auprès de *Korean Collection for Type Cultures* ("KCTC"), qui est l'un des centres de ressources biologiques les plus importants de Corée et qui effectue l'acquisition, la préservation et la distribution de ressources biologiques. La lignée cellulaire est disponible à la vente at KCTC (<https://kctc.kribb.re.kr/En/>).

Nom de la lignée cellulaire : 22Rv1/MMTV\_GR-KO (KCTC No. HC30009).

14. Pour maintenir la stabilité et l'intégrité de la réponse, on conserve les cellules à une température inférieure à -80°C (dans un congélateur ou dans de l'azote liquide, par exemple). Après décongélation, les cellules sont mises en culture secondaire au moins deux fois avant d'être utilisées pour l'évaluation de l'activité (anti-)androgénique des produits chimiques. Les cellules ne sont plus cultivées au-delà de 30 passages. Le temps de doublement des cellules est de 48 heures.

#### ***Conditions de dépôt et de culture des cellules***

15. Il convient de préparer les milieux suivants [pour de plus amples informations, consulter le mode opératoire normalisé du rapport de validation (10)] :

- Milieu de culture : RPMI1640 additionné de 10 % v/v de sérum de veau fœtal (SVF), de glutaMAX™ (2 mM), de pénicilline (100 unités/mL), de streptomycine (100 µg/mL) et d'amphotéricine B (0.25 µg/mL).
- Milieu d'essai : RPMI1640 sans rouge de phénol, additionné de 5 % v/v de sérum de veau fœtal traité au charbon enrobé de dextrane (DCC-FBS), de glutaMAX™ (2 mM), de pénicilline (100 unités/mL), de streptomycine (100 µg/mL) et d'amphotéricine B (0.25 µg/mL).

16. Le protocole de maintien de la lignée cellulaire 22Rv1/MMTV\_GR-KO est basé sur celui de la lignée ATCC 22Rv1 (11). Les cellules 22Rv1/MMTV\_GR-KO sont maintenues dans un milieu de culture qui comprend 200 µg/mL d'hygromycine comme marqueur de sélection du gène de la luciférase à utiliser la première fois après la décongélation des cellules. Une concentration de 0.1 % de trypsine-EDTA est préférable à une concentration de 0.05 % de trypsine-EDTA pour le passage de la lignée cellulaire 22Rv1/MMTV\_GR-KO, car cette concentration plus élevée améliore la dissociation des cellules de la plaque de culture cellulaire. Pour l'essai, les cellules sont mises en suspension dans le milieu d'essai à une densité de  $3.0 \times 10^5$  cellules/mL. Des aliquotes de 100 µL de cellules en suspension (soit  $3.0 \times 10^4$  cellules/puits) sont alors transférées dans une plaque 96 puits blanche. Les cellules sont ensuite pré-incubées à 37°C dans un incubateur à 5 % ± 0.5 % de CO<sub>2</sub> pendant les 48 heures qui précèdent l'exposition.

17. Le DCC-FBS est utilisé dans le milieu d'essai pour limiter autant que possible l'interférence des autres ingrédients du sérum.

#### ***Témoin véhicule, témoin positif agoniste et témoin positif antagoniste***

18. Pour l'essai agoniste, il convient de préparer sur chaque plaque d'essai des puits (n=4) contenant le témoin agoniste (TP<sub>AGO1</sub>) ayant reçu 10 nM de DHT comme traitement ; des puits (n=4) contenant le témoin véhicule (TV) ayant reçu uniquement 0.1 % de DMSO ; ainsi que des puits (n=4) contenant le témoin de cytotoxicité (TP<sub>CT</sub> ; 1 mM de LSS). La concentration de 10 nM de DHT est choisie de manière à obtenir une réponse de 100 % dans l'essai agoniste.

19. Pour l'essai antagoniste, il convient de préparer sur chaque plaque d'essai des puits (n=3) contenant le témoin véhicule (TV), des puits (n=3) contenant le témoin agoniste (TP<sub>AGO2</sub> ; 800 pM de DHT), des puits (n=3) contenant le témoin antagoniste (TP<sub>ANTA</sub> ; 800 pM de DHT et 1 µM de bicalutamide) et des puits (n=3) contenant le témoin de cytotoxicité (TP<sub>CT</sub> ; 800 pM de DHT et 1 mM de LSS).

#### ***Étalons de référence positifs et négatifs***

20. Il convient d'inclure les étalons de référence de chaque essai sur une plaque de chaque épreuve. Dans l'essai agoniste, il s'agit de trois étalons de référence bien caractérisés : deux étalons de référence positifs (DHT et mestanolone) et un étalon de référence négatif [phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP)].

Dans l'essai antagoniste, il s'agit de deux étalons de référence positifs (bicalutamide et bisphénol A) et d'un étalon de référence négatif (DEHP).

**Critères de qualité pour l'essai (ant)agoniste de l'AR**

21. Il convient que l'activité moyenne de la luciférase des TP [essai agoniste de l'AR : 10 nM de DHT (TP<sub>AGO1</sub>) ; essai antagoniste de l'AR : 800 pM de DHT (TP<sub>AGO2</sub>)] soit au moins 13 fois supérieure à la moyenne du témoin véhicule (TV) pour chaque plaque dans l'essai agoniste, et au moins 10 fois supérieure à la moyenne du TV dans l'essai antagoniste. S'agissant du contrôle de la qualité de l'essai, il convient que le coefficient multiplicateur d'induction correspondant à TP<sub>10</sub> soit supérieur à 1 + deux écarts-types (ET) d'induction du TV. Dans l'essai antagoniste, il convient aussi que l'activité transcriptionnelle relative (ATR) du TP<sub>ANTA</sub> (800 pM de DHT et 1 µM de bicalutamide), qui est une concentration unique sans courbe dose-réponse du bicalutamide, soit inférieure à 53.6 % de celle du TP<sub>AGO2</sub>.

**Critères d'acceptabilité**

**Tableau E.1. Critères d'acceptabilité de l'essai agoniste de l'AR**

Produits chimiques	LogTP <sub>10</sub>	LogTP <sub>50</sub>	Plage d'essai
5α-dihydrotestostérone (DHT)	-12.2 à -9.7	-10.6 à -9.0	1.0 x 10 <sup>-6</sup> à 1.0 x 10 <sup>-12</sup> M
Mestanolone	-12.3 à -9.8	-10.2 à -8.6	1.0 x 10 <sup>-6</sup> à 1.0 x 10 <sup>-12</sup> M
Phtalate de di-2-éthylhexyle (DEHP)	-	-	1.0 x 10 <sup>-5</sup> à 1.0 x 10 <sup>-11</sup> M
coefficient multiplicateur d'induction du TP <sub>AGO1</sub>	≥ 13		
coefficient multiplicateur d'induction correspondant à TP <sub>10</sub>	supérieur à 1+ 2 ET (induction du TV)		

Facteur d'induction du TP<sub>10</sub> (10%) de l'agoniste AR (TP<sub>AGO</sub> : 10nM du DHT)

ET : Ecart-type, VT : Véhicule témoin

22. Le coefficient multiplicateur d'induction du TP<sub>AGO1</sub> est calculé comme suit :

$$\text{coefficient multiplicateur d'induction du TP}_{\text{AGO1}} = \frac{\text{Moyenne des URL du TP}_{\text{AGO1}} (10 \text{ nM de DHT})}{\text{Moyenne des URL du témoin véhicule}}$$

• URL : unités relatives de lumière

Tableau E.2. Critères d'acceptabilité de l'essai antagoniste de l'AR

Produits chimiques	LogCl <sub>30</sub>	LogCl <sub>50</sub>	Plage d'essai
Bicalutamide	-7.5 à -6.2	-7.0 à -5.8	1.0 x 10 <sup>-4</sup> à 1.0 x 10 <sup>-10</sup> M
Bisphénol A	-6.6 à -5.4	-6.2 à -5.0	1.0 x 10 <sup>-5</sup> à 1.0 x 10 <sup>-11</sup> M
DEHP	-	-	1.0 x 10 <sup>-5</sup> à 1.0 x 10 <sup>-11</sup> M
coefficient multiplicateur d'induction du TP <sub>AGO2</sub>	≥ 10		
ATR du TP <sub>ANTA</sub> (%)	≤ 53.6		

23. Le coefficient multiplicateur d'induction du TP<sub>AGO2</sub> est calculé comme suit :

$$\text{coefficient multiplicateur d'induction du TP}_{\text{AGO2}} = \frac{\text{Moyenne des URL du TP}_{\text{AGO2}} \text{ (800 pM de DHT)}}{\text{Moyenne des URL du témoin véhicule}}$$

$$\text{ATR du TP}_{\text{ANTA}} \text{ (\%)} = \frac{\text{Moyenne des URL du TP}_{\text{ANTA}} - \text{Moyenne des URL du TV}}{\text{Moyenne des URL du TP}_{\text{AGO2}} - \text{Moyenne des URL du TV}} \times 100$$

•ATR : activité transcriptionnelle relative

### Essai de solubilité

24. L'essai de solubilité est mené conformément au document-guide sur les bonnes pratiques applicables aux méthodes *in vitro* (OCDE) (13). Des stocks de produits chimiques d'essai sont préparés à une concentration maximale de 1 M (solution-mère ; 0.1 % de la solution-mère dans les puits avec cellules, soit 1 mM) dans du DMSO, ou un autre solvant approprié. En cas de précipitation, la solution-mère est préparée de nouveau à une nouvelle concentration 10 fois inférieure à celle de la solution-mère d'origine jusqu'à ce qu'aucune précipitation ne soit observée.

### Exposition aux produits chimiques et configuration de la plaque d'essai

#### Épreuve préliminaire dans l'essai agoniste de l'AR

25. La concentration maximale de chaque stock de produits chimiques d'essai, déterminée par l'essai de solubilité (voir ci-dessus), fait l'objet d'une dilution en série au 1/10 dans du DMSO (ou un autre solvant approprié). Ces dilutions sont ensuite ajoutées au milieu aqueux de façon à obtenir une concentration finale de DMSO de 0.1 %. Le volume final recommandé pour chaque puits est de 100 µL (le milieu d'essai de la plaque d'essai est retiré et remplacé par les produits chimiques d'essai dans le milieu d'essai). Toutes les concentrations sont testées en triplicat. Il convient de soumettre les étalons de référence de l'essai agoniste de l'AR (DHT, mestanolone et DEHP) à chaque essai. Dans l'essai agoniste de l'AR, chaque plaque comprend des puits ayant reçu comme traitement 10 nM de DHT (TP<sub>AGO1</sub>), des puits ayant reçu

comme seul traitement 0.1 % de DMSO (TV) et des puits ayant reçu comme traitement 1 mM de LSS (TP<sub>CT</sub>) (tableau E.3). Le tableau E.4 donne un exemple de configuration des plaques. Après l'ajout des produits chimiques d'essai, les plaques d'essai sont placées à une température de 37°C ± 1°C dans un incubateur à 5 % ± 0.5 % de CO<sub>2</sub> pendant 20-24 heures.

**Tableau E.3. Exemple de répartition des concentrations de produits chimiques de référence dans la plaque d'essai (en M)**

	DHT			Mestanolone			DEHP			Produit chimique d'essai		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-3</sup>	→	→
B	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-4</sup>	→	→
C	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→
D	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→
E	1.0x10 <sup>-10</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-10</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→
F	1.0x10 <sup>-11</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-11</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-10</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→
G	1.0x10 <sup>-12</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-12</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-11</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→
H	<b>TV</b>	→	→	→	<b>TP<sub>AGO1</sub></b>	→	→	→	<b>TP<sub>CT</sub></b>	→	→	→

- TV : témoin véhicule (0.1 % de DMSO)
- TP<sub>AGO1</sub> : témoin positif agoniste de l'AR (10 nM de DHT)
- TP<sub>CT</sub> : témoin de cytotoxicité (1 mM de LSS)



Tableau E.4. Exemple de répartition des concentrations de produits chimiques d'essai dans la plaque d'essai (en M)

	Produit chimique d'essai 1			Produit chimique d'essai 2			Produit chimique d'essai 3			Produit chimique d'essai 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.0x10 <sup>-3</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-3</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→
B	1.0x10 <sup>-4</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-4</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→
C	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→
D	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→
E	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-10</sup>	→	→
F	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-10</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-11</sup>	→	→
G	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-11</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-12</sup>	→	→
H	<b>TV</b>	→	→	→	<b>TP<sub>AGO1</sub></b>	→	→	→	<b>TP<sub>CT</sub></b>	→	→	→

- TV : témoin véhicule (0.1 % de DMSO)
- TP<sub>AGO1</sub> : témoin positif agoniste de l'AR (10 nM de DHT)
- TP<sub>CT</sub> : témoin de cytotoxicité (1 mM de LSS)

### Épreuve complète dans l'essai antagoniste de l'AR

26. Les produits chimiques d'essai qui sont identifiés comme étant des agonistes de l'AR lors de l'épreuve préliminaire sont testés de manière plus approfondie dans le cadre d'une épreuve complète. La concentration maximale du produit chimique d'essai, déterminée à partir de la courbe concentration-réponse obtenue lors de l'épreuve préliminaire, fait l'objet d'une dilution en série aux 1/3 ou 1/5 dans du DMSO (voir l'annexe E.1). Ces dilutions sont ensuite ajoutées au milieu aqueux de façon à obtenir une concentration finale de DMSO de 0.1 %, et toutes les concentrations sont testées en triplicat. Il convient de mener tous les essais à des concentrations où la courbe concentration-réponse peut être bien caractérisée. Pour satisfaire à ces conditions, il convient d'exclure de l'analyse finale les solutions qui contiennent des solides insolubles ou qui engendrent des effets cytotoxiques sur les lignées cellulaires. Le volume final recommandé pour chaque puits est de 100 µL (le milieu d'essai de la plaque d'essai est retiré et remplacé par les produits chimiques d'essai dans le milieu d'essai). La répartition des concentrations d'étalons de référence et de produits chimiques d'essai dans la plaque est la même que dans l'épreuve préliminaire. Après l'ajout des produits chimiques d'essai, les plaques d'essai sont placées à une température de 37 °C ± 1 °C dans un incubateur à 5 % ± 0.5 % de CO<sub>2</sub> pendant 20-24 heures.

### Épreuve préliminaire dans l'essai antagoniste de l'AR

27. La concentration maximale de chaque stock de produits chimiques d'essai, déterminée par l'essai de solubilité (voir ci-dessus), fait l'objet d'une dilution en série au 1/10 dans du DMSO. Ces dilutions sont ensuite ajoutées au milieu aqueux de façon à obtenir une concentration finale de DMSO de 0.1 %. Le volume final recommandé pour chaque puits est de 100 µL (le milieu d'essai de la plaque d'essai est retiré et remplacé par les produits chimiques d'essai dans le milieu d'essai). Il convient de soumettre les étalons de référence de l'essai antagoniste de l'AR (bicalutamide, bisphénol A et DEHP) à chaque essai. Dans l'essai antagoniste de l'AR, chaque plaque comprend un témoin agoniste de l'AR (TP<sub>AGO2</sub>; 800 pM de DHT), un témoin antagoniste de l'AR (TP<sub>ANTA</sub>; 800 pM de DHT et 1 µM de bicalutamide) et un témoin de cytotoxicité (TP<sub>CT</sub>; 800 pM de DHT et 1 mM de LSS) sont préparés (tableau E.5). Le tableau E.6 illustre la configuration des plaques. À l'exception de ceux du TV, tous les puits sont additionnés d'une concentration fixe du produit chimique de référence agoniste (800 pM de DHT), l'objectif étant de mesurer

l'atténuation de la réponse agoniste. Après l'ajout des produits chimiques d'essai, les plaques d'essai sont placées à une température de 37 °C±1 °C dans un incubateur à 5 % ± 0.5 % de CO<sub>2</sub> pendant 20-24 heures.

Tableau E.5. Exemple de répartition des concentrations d'étalons de référence dans la plaque d'essai (en M)

	Bicalutamide			Bisphénol A			DEHP			Produit chimique d'essai 1		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.0x10 <sup>-4</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-3</sup>	→	→
B	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-4</sup>	→	→
C	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→
D	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→
E	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→
F	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-10</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-10</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→
G	1.0x10 <sup>-10</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-11</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-11</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→
H	TV			TP <sub>AGO2</sub>			TP <sub>ANTA</sub>			TP <sub>CT</sub>		

- TV : témoin véhicule (0.1 % de DMSO)
- TP<sub>AGO2</sub>: témoin agoniste de l'AR dans l'essai antagoniste de l'AR (800 pM de DHT)
- TP<sub>ANTA</sub> : témoin antagoniste de l'AR (1 µM de bicalutamide)
- TP<sub>CT</sub> : témoin de cytotoxicité (1 mM de LSS)
- Les puits grisés sont additionnés de 800 pM de DHT.

Tableau E.6. Exemple de répartition des concentrations de produits chimiques d'essai dans la plaque d'essai (en M)

	Produit chimique d'essai 1			Produit chimique d'essai 2			Produit chimique d'essai 3			Produit chimique d'essai 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.0x10 <sup>-3</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-3</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-3</sup>	→	→
B	1.0x10 <sup>-4</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-4</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-4</sup>	→	→
C	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-5</sup>	→	→
D	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-6</sup>	→	→
E	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-7</sup>	→	→
F	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-10</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-8</sup>	→	→
G	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-11</sup>	→	→	1.0x10 <sup>-9</sup>	→	→
H	TV			TP <sub>AGO2</sub>			TP <sub>ANTA</sub>			TP <sub>CT</sub>		

- TV : témoin véhicule (0.1 % de DMSO)
- TP<sub>AGO2</sub> : témoin agoniste de l'AR dans l'essai antagoniste de l'AR (800 pM de DHT)
- TP<sub>ANTA</sub> : témoin antagoniste de l'AR (1 µM de bicalutamide)
- TP<sub>CT</sub> : témoin de cytotoxicité (1 mM de LSS)
- Les puits grisés sont additionnés de 800 pM de DHT.

### Épreuve complète et contrôle de la spécificité dans l'essai antagoniste de l'AR

28. Pour confirmer un antagonisme positif identifié lors de l'épreuve préliminaire, on conduit une épreuve complète et un contrôle de la spécificité en utilisant à la fois 800 pM de DHT et 100 nM de DHT. L'inclusion de ces deux concentrations de DHT dans l'essai antagoniste devrait entraîner un décalage entre les courbes concentration-réponse des « vrais » antagonistes de l'AR et permettre de faire la distinction entre ces produits chimiques et les faux positifs éventuels. La concentration maximale du produit chimique d'essai, déterminée à partir des courbes concentration-réponse obtenues lors de l'épreuve préliminaire, fait l'objet d'une dilution en série aux 1/3 ou 1/5 dans du DMSO (voir l'annexe E.1). Ces dilutions sont ensuite ajoutées au milieu aqueux de façon à obtenir une concentration finale de DMSO de 0.1 %, et toutes les concentrations sont testées en triplicat. Le volume final recommandé pour chaque puits est de 100 µL (le milieu d'essai de la plaque d'essai est retiré et remplacé par les produits chimiques d'essai dans le milieu d'essai). La répartition des concentrations d'étalons de référence dans la plaque est la même que dans l'épreuve préliminaire, et la répartition des concentrations de produits chimiques d'essai est indiquée dans le tableau E.7. Pour l'essai antagoniste de l'AR, on utilise un témoin agoniste de l'AR (TP<sub>AGO2</sub> ; 800 pM de DHT), un témoin antagoniste de l'AR (TP<sub>ANTA</sub> ; 800 pM de DHT et 1 µM de bicalutamide) et un témoin de cytotoxicité (TP<sub>CT</sub> ; 800 pM de DHT et 1 mM de LSS). Le tableau E.7 illustre la configuration des plaques. Après l'ajout des produits chimiques d'essai, les plaques d'essai sont placées à une température de 37 °C ± 1°C dans un incubateur à 5 % ± 0.5 % de CO<sub>2</sub> pendant 20-24 heures.

Tableau E.7. Exemple de répartition des concentrations de produits chimiques d'essai dans la plaque d'essai (en logM)

	Produit chimique d'essai 1						Produit chimique d'essai 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-5	→	→	-5	→	→	-4	→	→	-4	→	→
B	-5.7	→	→	-5.7	→	→	-4.7	→	→	-4.7	→	→
C	-6.4	→	→	-6.4	→	→	-5.4	→	→	-5.4	→	→
D	-7.1	→	→	-7.1	→	→	-6.1	→	→	-6.1	→	→
E	-7.8	→	→	-7.8	→	→	-6.8	→	→	-6.8	→	→
F	-8.5	→	→	-8.5	→	→	-7.5	→	→	-7.5	→	→
G	-9.2	→	→	-9.2	→	→	-8.2	→	→	-8.2	→	→
H	TV			TP <sub>AGO2</sub>			TP <sub>ANTA</sub>			TP <sub>CT</sub>		

- TV : témoin véhicule (DMSO) ;
- TP<sub>AGO2</sub> : témoin agoniste de l'AR (800 pM de DHT) ;
- TP<sub>ANTA</sub> : témoin antagoniste de l'AR (1 µM de bicalutamide) ;
- TP<sub>CT</sub> : témoin de cytotoxicité (1 mM de LSS) ;
- Les puits repérés en gris clair sont additionnés de 800 pM de DHT ;
- Les puits repérés en gris foncé sont additionnés de 100 nM de DHT.

### Mesures de l'effet observé

29. On effectue les mesures à l'aide du système de mesure de la luciférase Steady-Glo (Promega, E2510, ou équivalents, par exemple) en ce qui concerne la réponse de l'AR, et à l'aide du système de détection des protéases dans les cellules vivantes (essai de détermination de la viabilité cellulaire CellTiter-Fluor™, Promega, G6080, ou équivalents, par exemple) en ce qui concerne la cytotoxicité. Les mesures de la viabilité cellulaire et de l'activité de la luciférase sont effectuées dans la même plaque.

30. Pour l'essai de viabilité cellulaire :

- Préparer le réactif de l'essai de détermination de la viabilité cellulaire (CellTiter-Fluor™) en suivant les instructions du fabricant.
- Ajouter directement 20 µL/puits de réactif de l'essai de détermination de la viabilité cellulaire dans les puits d'essai contenant le milieu avec les produits chimiques d'essai.
- Mélanger brièvement à l'aide d'un agitateur orbital.
- Incuber les plaques d'essai à une température de 37°C ± 1°C dans un incubateur à 5 % ± 0.5 % de CO<sub>2</sub> pendant 1 à 3 heures.
- Retirer les plaques de l'incubateur et mesurer la cytotoxicité à l'aide d'un fluorimètre (380-400 nm Ex /505 nm Em).

31. Pour la mesure de la luciférase :

- Préparer le réactif du système de mesure de la luciférase (Steady-Glo) en suivant les instructions du fabricant.
- Ajouter directement 50 µL/puits de réactif du système de mesure de la luciférase dans les puits d'essai après l'essai de détermination de la viabilité cellulaire.

- Recouvrir la plaque d'essai avec une feuille d'aluminium pour empêcher la lumière de filtrer, et laisser à température ambiante pendant 5-10 min.
- Mesurer l'activité de la luciférase à l'aide d'un lecteur de luminescence.

## Analyse des données

### Cytotoxicité

32. La cytotoxicité, exprimée en URF par le fluorimètre, est enregistrée et transformée comme suit :
- La moyenne pour le témoin agoniste de l'AR et le témoin antagoniste de l'AR (essai agoniste de l'AR : 10 nM de DHT, essai antagoniste de l'AR : 800 pM de DHT) est fixée à 100 %.
  - La moyenne pour le témoin de cytotoxicité (essai agoniste de l'AR : 1 mM de LSS, essai antagoniste de l'AR : 800 pM de DHT et 1 mM de LSS) est fixée à 0 %.
33. Si les résultats de l'essai de viabilité cellulaire indiquent que la concentration du produit chimique d'essai a réduit la viabilité cellulaire de 20 % ou plus, cette concentration est considérée comme cytotoxique. Toutes les concentrations considérées comme cytotoxiques sont exclues de l'évaluation.
34. Dans l'essai de viabilité cellulaire, on calcule la viabilité cellulaire en fonction des données exprimées en URF comme suit :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{Moyenne des URF du produit chimique d'essai} - \text{moyenne des URF du TP}_{\text{CT}}}{\text{Moyenne URF du TP} - \text{moyenne URF du TP}_{\text{CT}}} \times 100$$

- URF : unités relatives de fluorescence

### Activité de la luciférase

35. Les données des signaux luminescents, exprimées en URL par le luminomètre, sont enregistrées et transformées comme suit :
- La moyenne pour le témoin agoniste de l'AR et le témoin antagoniste de l'AR (témoin agoniste de l'AR : 10 nM de DHT, témoin antagoniste de l'AR : 800 pM de DHT) est fixée à 100 %.
  - La moyenne pour le témoin véhicule (0.1 % de DMSO) est fixée à 0 %.
36. Pour les essais agoniste et antagoniste, on calcule l'ATR en fonction des données exprimées en URL comme suit :

$$\text{ATR (\%)} = \frac{\text{Moyenne des URL du produit chimique d'essai} - \text{Moyenne des URL du TV}}{\text{Moyenne des URL du TP} - \text{moyenne des URL du TV}} \times 100$$

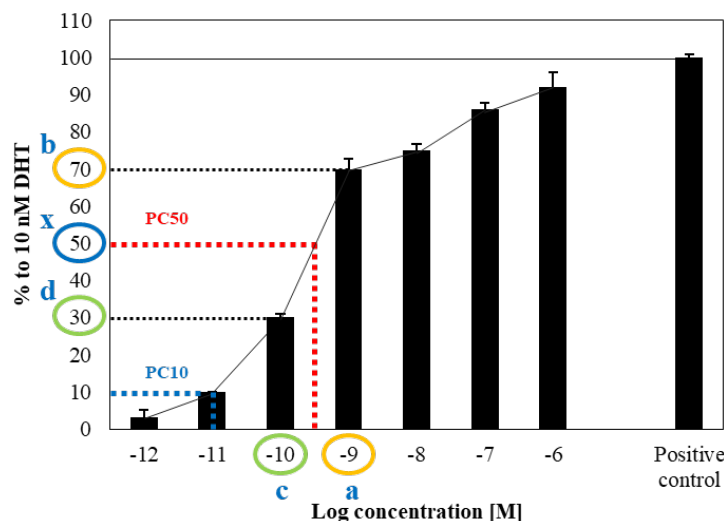
- URL : unités relatives de lumière
- ATR : activité transcriptionnelle relative

**Calcul des paramètres**

37. Dans l'essai agoniste de l'AR, il convient de fournir les données suivantes pour les produits chimiques d'essai positifs : les concentrations dont l'effet correspond à 10 % de l'effet du témoin positif (logTP<sub>10</sub>) et, le cas échéant, 50 % de l'effet du témoin positif (logTP<sub>50</sub>). Le graphique E.2 illustre les résultats obtenus pour logTP<sub>x</sub>, « x » étant une réponse sélectionnée comme 10 % ou 50 % d'induction par rapport à l'effet de TP<sub>AGO1</sub>. Les valeurs logTP<sub>10</sub> et logTP<sub>50</sub> peuvent être définies comme les concentrations du produit chimique d'essai dont on estime qu'elles induisent 10 % et 50 %, respectivement, de l'activité transcriptionnelle induite par le TP<sub>AGO1</sub> (10 nM de DHT). Chaque valeur logTP<sub>x</sub> peut être calculée à l'aide d'une régression linéaire simple à deux variables pour l'activité transcriptionnelle. Considérant que les points immédiatement au-dessus et en-dessous de la valeur logTP<sub>x</sub> ont pour coordonnées respectives (a,b) et (c,d), la valeur logTP<sub>x</sub> est calculée à l'aide de la formule suivante, dont le graphique E.2 fournit une illustration pour logTP<sub>50</sub> :

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

**Graphique E.2. Schéma descriptif du calcul des valeurs logTP<sub>x</sub>**



% to 10 nM DHT : % par rapport à 10 nM de DHT

PC50 : TP<sub>50</sub>

PC10 : TP<sub>10</sub>

Log concentration [M] : Log concentration [M]

Positive control : témoin positif

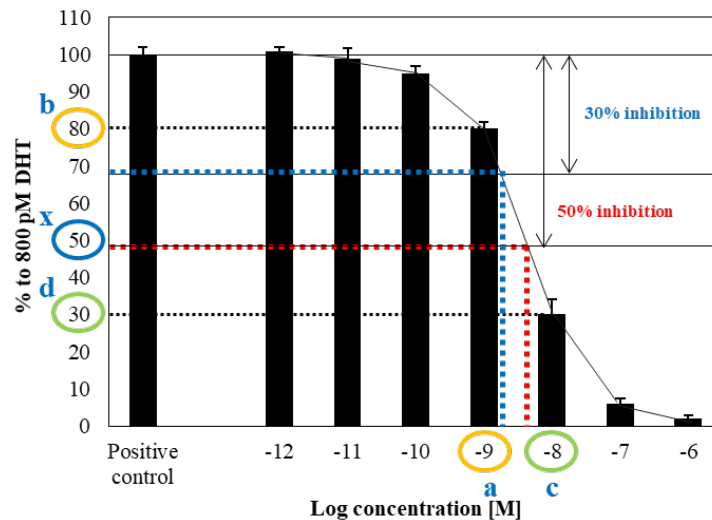
- Dans l'essai agoniste de l'AR, chaque plaque d'essai inclut le TP<sub>AGO1</sub> (10 nM de DHT).

38. Dans l'essai antagoniste de l'AR, il convient de fournir les données suivantes pour les produits chimiques d'essai positifs : les concentrations provoquant une inhibition de 30 % de l'activité transcriptionnelle induite par 800 pM de DHT (logCl<sub>30</sub>) et, le cas échéant, une inhibition de 50 % de l'activité transcriptionnelle induite par 800 pM de DHT (logCl<sub>50</sub>). Le graphique E.3 illustre les résultats obtenus pour logCl<sub>x</sub>, « x » étant une réponse sélectionnée comme 30 % ou 50 % d'inhibition par rapport à l'effet de TP<sub>AGO2</sub>. Les valeurs logCl<sub>50</sub> et logCl<sub>30</sub> peuvent être définies comme les concentrations du produit chimique

d'essai dont on estime qu'elles provoquent une inhibition de 50 % et 30 %, respectivement, de l'activité transcriptionnelle induite par 800 pM de DHT. Chaque valeur  $\log CI_x$  peut être calculée à l'aide d'une régression linéaire simple à deux variables pour l'activité transcriptionnelle. Considérant que les points immédiatement au-dessus et en-dessous de la valeur  $\log CI_x$  ont pour coordonnées respectives (c, d) et (a, b), la valeur  $\log CI_x$  est calculée à l'aide de la formule suivante, dont le graphique E.3 fournit une illustration pour  $\log CI_{50}$  :

$$\text{Log}[CI_x] = a - [(b - (100 - x)) / (b - d)](a - c)$$

Graphique E.3. Schéma descriptif du calcul des valeurs  $\log CI_x$



- % to 800 pM DHT : % par rapport à 800 pM de DHT
- Positive control : témoin positif
- Log concentration [M] : Log concentration [M]
- 30% inhibition : 30 % d'inhibition
- 50% inhibition : 50 % d'inhibition

- Dans l'essai antagoniste de l'AR, chaque plaque d'essai inclut le TP<sub>AGO2</sub> (800 pM de DHT).

39. Dans le cas du contrôle de la spécificité, pour faire la distinction entre les réponses générées par les deux concentrations de DHT, on utilise  $Y_c$  pour l'induction relative à la concentration c avec 800 pM de DHT, et  $S_c$  pour l'induction relative à la concentration c avec 100 nM de DHT. On calcule  $Y_c$  et  $S_c$  en fonction des données exprimées en URL comme suit :

$$Y_c \text{ ou } S_c (\%) = \frac{\text{Moyenne des URL du produit chimique d'essai} - \text{Moyenne des URL du TV}}{\text{Moyenne des URL du TP}_{AGO2} - \text{moyenne des URL du TV}} \times 100$$

40. Pour déterminer si les produits chimiques d'essai sont de véritables antagonistes (compétitifs) de l'AR, on calcule le carré  $R^2$  du coefficient de corrélation entre l'induction relative de la réponse standard  $Y_c$  et l'induction relative de la réponse de spécificité  $S_c$ . Si  $R^2$  est inférieur à 0.9, le produit chimique d'essai est considéré comme un véritable antagoniste de l'AR. La formule de calcul de  $R^2$  pour l'identification des

véritables antagonistes de l'AR est consultable dans le rapport de validation (6). La prudence s'impose, car ce critère ne permet pas de conclure à 100 % (comme le montre le rapport de validation de la méthode d'essai AR-CALUX®). En effet, la forme des courbes et les valeurs aberrantes peuvent avoir eu une influence. Le recours à un jugement d'expert peut se révéler nécessaire.

41. Lors de l'interprétation des données des essais agoniste et antagoniste, il convient de prendre en compte la présence de degrés croissants de cytotoxicité pouvant altérer de façon importante, voire éliminer, la réponse sigmoïde type. C'est pour cette raison que l'activation transcriptionnelle médiée par l'AR et la cytotoxicité sont évaluées simultanément dans la même plaque d'essai. Si les résultats du test de cytotoxicité indiquent que la concentration du produit chimique d'essai a réduit la viabilité cellulaire de 20 % ou plus, cette concentration est alors considérée comme cytotoxique, et toutes les concentrations supérieures ou égales à ce seuil de cytotoxicité sont exclues de l'évaluation.

### Critères d'interprétation des données

42. Les critères permettant d'interpréter les données et de décider si, en l'absence de cytotoxicité, un produit chimique d'essai est considéré comme positif ou négatif sont indiquées dans le tableau E.8.

43. Un produit chimique est classé dans la catégorie des agonistes de l'AR si une épreuve préliminaire positive ayant permis de déterminer une valeur  $\log TP_{10}$  est suivie de deux épreuves complètes aux résultats concordants et, si ces résultats ne sont pas concordants, d'une troisième épreuve complète. En cas d'épreuve préliminaire négative, il convient de confirmer le résultat avec une (deuxième) épreuve préliminaire de suivi. Si cette deuxième épreuve préliminaire est positive après une première épreuve négative, une troisième épreuve préliminaire a lieu. Dans le cas de l'essai antagoniste de l'AR, la valeur  $\log CI_{30}$  est calculée dans le cadre d'une épreuve préliminaire puis confirmée par au moins deux épreuves complètes (trois maximum) (en l'absence de cytotoxicité) parallèlement à un contrôle de la spécificité. Si le  $R^2$  du produit chimique d'essai du contrôle de la spécificité est inférieur à 0.9, le produit chimique d'essai peut être considéré comme un véritable antagoniste de l'AR, mais le recours à un jugement d'expert peut se révéler nécessaire (voir le paragraphe 40). Les produits chimiques qui ne sont pas des antagonistes de l'AR sont classés sur la base des résultats négatifs (en l'absence de résultats positifs) obtenus dans le cadre d'au moins deux épreuves préliminaires (tableau E.8).



Tableau E.8 : Critères permettant de décider qu'un produit chimique est positif ou négatif

<b>Essai agoniste de l'AR</b>	<b>Positif</b>	Si la $RTP_{max}$ obtenue est supérieure ou égale à 10 % de la réponse du témoin positif.
	<b>Négatif</b>	Dans tous les autres cas.
<b>Essai antagoniste de l'AR</b>	<b>Positif</b>	Si le produit chimique d'essai satisfait aux critères suivants : i) sa valeur $\log CI_{30}$ est calculée en l'absence de cytotoxicité et ii) $R^2$ est inférieur à 0.9 dans le contrôle de la spécificité.
	<b>Négatif</b>	Dans tous les autres cas.

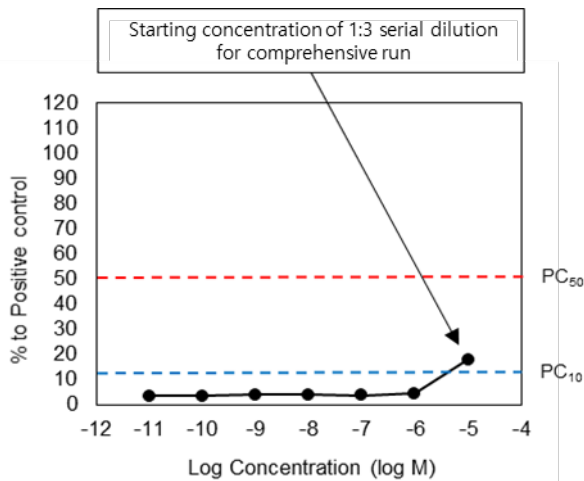
- Tous les résultats sont obtenus en l'absence de cytotoxicité.

## Bibliographie

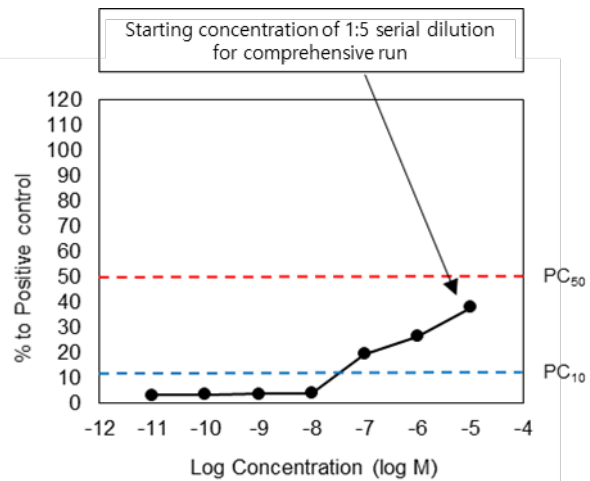
1. Kim H.J., Park Y.I., Dong M.S. (2006) Comparison of prostate cancer cell lines for androgen receptor-mediated reporter gene assays. *Toxicology In Vitro* 20, 1159–1167.
2. Sun S, Park E.J, Choi Y.H., Lee H.S., Ahn B.Y. and Dong M.S. 2016. Development and validation of an in vitro transactivation assay for detection of (anti)androgenic potential compounds using 22Rv1/MMTV cells. *Reproductive Toxicology* 60, 156–166.
3. Yen P.M., Liu Y., Palvimo J.J., Trifiro M., Whang J., Pinsky L., Janne O.A. and Chin W.W. 1997. Mutant and wild-type androgen receptors exhibit cross-talk on androgen- glucocorticoid-, and progesterone-mediated transcription. *Molecular Endocrinology* 11, 162-171.
4. Zwart, N., Andringa, D., de Leeuw, W.J., Kojima, H., Iida, M., Houtman, C. 2017. Improved androgen specificity of AR-Ecoscreen by CRISPR based glucocorticoid receptor knockout. *Toxicology in Vitro* 45, 1-9.
5. Lee H.S., Lee S.H. and Park Y.H. 2019. Enhancement of androgen transcriptional activation assay based on genome edited glucocorticoid knock out human prostate cancer cell line. *Environmental Research* 171, 437-443.
6. Validation Study Report of 22Rv1/MMTV\_GR-KO ARTA assay. (2019). Available at ([http://www.nifds.go.kr/brd/m\\_18/view.do?seq=12486&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm\\_seq\\_1=0&itm\\_seq\\_2=0&multi\\_itm\\_seq=0&company\\_cd=&company\\_nm=&page=1](http://www.nifds.go.kr/brd/m_18/view.do?seq=12486&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1))
7. OECD (2012) Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for or endocrine disruption. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment. No. 150. [ENV/JM/MONO\(2012\)22](#).
8. OECD (2005) Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment. No. 34. [ENV/JM/MONO\(2005\)14](#).
9. OECD (2016) OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonistic Activity of Chemicals.
10. Validation report of the 22Rv1/MMTV\_GR-KO AR TA assay: An *in vitro* assay for identifying human androgen receptor agonists and antagonists.
11. ATCC 22Rv1 culture method. Available at ([https://www.atcc.org/products/all/CRL-2505.aspx#culture method](https://www.atcc.org/products/all/CRL-2505.aspx#culture%20method))
12. Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M. and Ishii H (1995), Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.* 57, 769–771.
13. OECD (2018) Guidance document on good in vitro method practices (GIVIMP). OECD series on Testing and Assessment. No. 286. OECD Publishing Paris.

## Annexe E.1

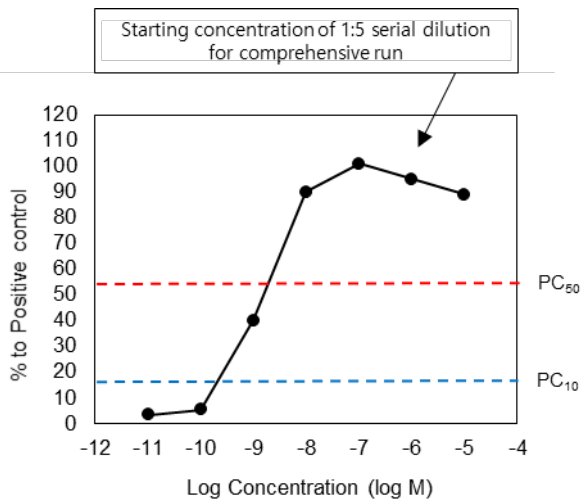
1. Méthode de détermination de la concentration maximale dans l'épreuve complète
2. Si les produits chimiques d'essai sont jugés positifs lors de l'épreuve préliminaire, il convient de procéder à une épreuve complète pour déterminer avec précision leur réponse. Tous les produits chimiques d'essai classés positifs en ce qui concerne l'activité agoniste de l'AR devraient avoir une courbe concentration-réponse composée d'un palier et d'une pente positive ; tous les produits chimiques d'essai classés positifs en ce qui concerne l'activité antagoniste de l'AR devraient avoir une courbe concentration-réponse composée d'un palier et d'une pente négative. Si possible, les valeurs  $TP_{10}$ ,  $TP_{50}$ ,  $CI_{30}$  et  $CI_{50}$  sont calculées pour chaque décision positive. L'épreuve complète (ant)agoniste de l'AR se fait avec sept niveaux de dilution en série (aux 1/3 ou 1/5), chaque concentration étant testée en triplicat sur la plaque 96 puits. Pour déterminer les concentrations de départ de l'épreuve complète, il convient d'utiliser les critères suivants :
  - Si les résultats de l'épreuve préliminaire tendent à montrer que le produit chimique d'essai est positif avec seulement la réponse correspondant à la valeur  $TP_{10}$  dans l'essai agoniste de l'AR (et si un seul point de la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai se trouve au-dessus du seuil de décision positive sans cytotoxicité), l'épreuve complète est réalisée avec 7 niveaux de dilution en série au 1/3 en commençant par la concentration d'exposition maximale (voir l'exemple 1).
  - Si les résultats de l'épreuve préliminaire tendent à montrer que le produit chimique d'essai est positif avec seulement la réponse correspondant à la valeur  $TP_{10}$  dans l'essai agoniste de l'AR (et si plusieurs points de la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai se trouvent au-dessus du seuil de décision positive sans cytotoxicité), l'épreuve complète est réalisée avec 7 niveaux de dilution en série au 1/5 en commençant par la concentration d'exposition maximale (voir l'exemple 2).
  - Si les résultats de l'épreuve préliminaire tendent à montrer que le produit chimique d'essai est positif avec les réponses correspondant aux valeurs  $TP_{10}$  et  $TP_{50}$  dans l'essai agoniste de l'AR (plusieurs points de la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai se trouvent au-dessus du seuil de décision positive sans cytotoxicité), l'épreuve complète est réalisée avec 7 niveaux de dilution en série au 1/5 en commençant par la concentration dix fois supérieure à la concentration donnant le niveau de réponse le plus élevé dans l'épreuve préliminaire (voir l'exemple 3).
  - Si les résultats de l'épreuve préliminaire tendent à montrer que le produit chimique d'essai est positif avec uniquement la réponse correspondant à la valeur  $TP_{50}$  (ou qu'on ne peut pas calculer la valeur  $TP_{50}$  mais que l'activité maximale est supérieure à 10%) dans l'essai agoniste de l'AR (tous les points de la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai se trouvent au-dessus du seuil de décision positive sans cytotoxicité), l'épreuve complète est réalisée avec 7 niveaux de dilution en commençant par la concentration dix fois supérieure à la concentration donnant le niveau de réponse le plus élevé dans l'épreuve préliminaire (voir l'exemple 4).



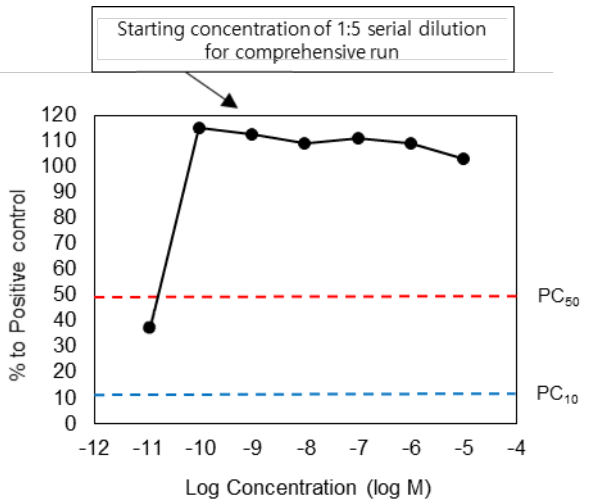
Exemple 1



Exemple 2



Exemple 3



Exemple 4

% to positive control : % par rapport au témoin positif  
 Log concentration (log M) : Log concentration (log M)  
 $PC_{50} = TP_{50}$   
 $PC_{10} = TP_{10}$

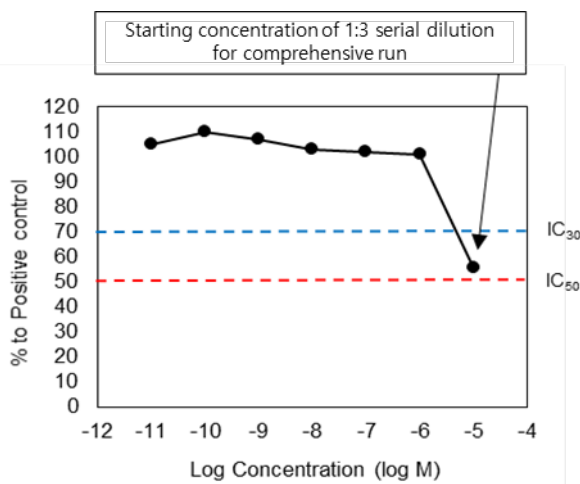
Légende exemple 1 : concentration de départ de la dilution en série au 1/3 dans l'épreuve complète

Légende exemples 2, 3 et 4 : concentration de départ de la dilution en série au 1/5 dans l'épreuve complète

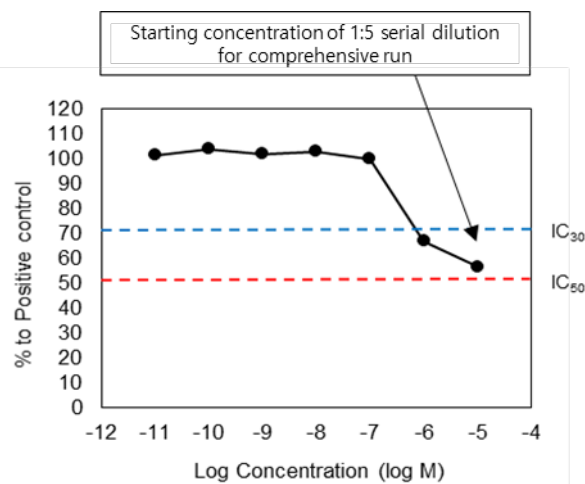
- Si les résultats de l'épreuve préliminaire tendent à montrer que le produit chimique d'essai est positif avec seulement la réponse correspondant à la valeur  $CI_{30}$  dans l'essai antagoniste de l'AR (et si un seul point de la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai se trouve au-dessus du seuil de décision positive sans cytotoxicité), l'épreuve complète est réalisée avec 7 niveaux de dilution en série au 1/3 en commençant par la concentration d'exposition maximale (voir l'exemple 5).
- Si les résultats de l'épreuve préliminaire tendent à montrer que le produit chimique d'essai est positif avec seulement la réponse correspondant à la valeur  $CI_{30}$  dans l'essai antagoniste de

l'AR (et si plusieurs points de la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai se trouvent au-dessus du seuil de décision positive sans cytotoxicité), l'épreuve complète est réalisée avec 7 niveaux de dilution en série au 1/5 en commençant par la concentration d'exposition maximale (voir l'exemple 6).

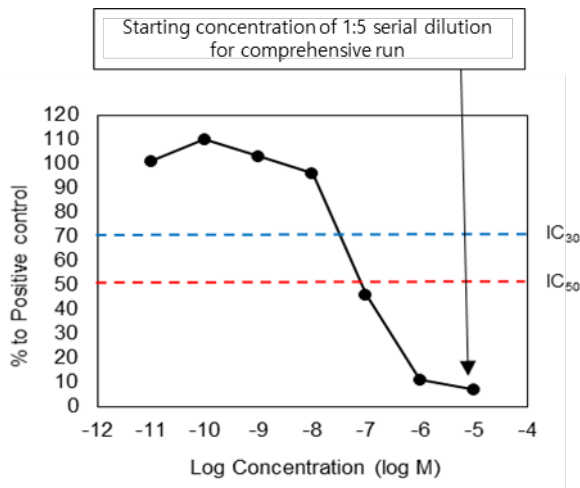
- Si les résultats de l'épreuve préliminaire tendent à montrer que le produit chimique d'essai est positif avec les réponses correspondant aux valeurs  $CI_{30}$  et  $CI_{50}$  dans l'essai antagoniste de l'AR (si plusieurs points de la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai se trouvent au-dessus du seuil de décision positive sans cytotoxicité), l'épreuve complète est réalisée avec 7 niveaux de dilution en série au 1/5 en commençant par la concentration donnant le niveau de réponse le plus élevé dans l'épreuve préliminaire (voir l'exemple 7).
- Si les résultats de l'épreuve préliminaire tendent à montrer que le produit chimique d'essai est positif avec seulement la réponse correspondant à la valeur  $CI_{50}$  (ou qu'on ne peut pas calculer la valeur  $CI_{50}$ ) dans l'essai antagoniste de l'AR (si tous les points de la courbe concentration-réponse du produit chimique d'essai se trouvent au-dessus du seuil de décision positive sans cytotoxicité), l'épreuve complète est réalisée avec 7 niveaux de dilution en série au 1/5 en commençant par la concentration donnant le niveau de réponse le plus élevé dans l'épreuve préliminaire (voir l'exemple 8).



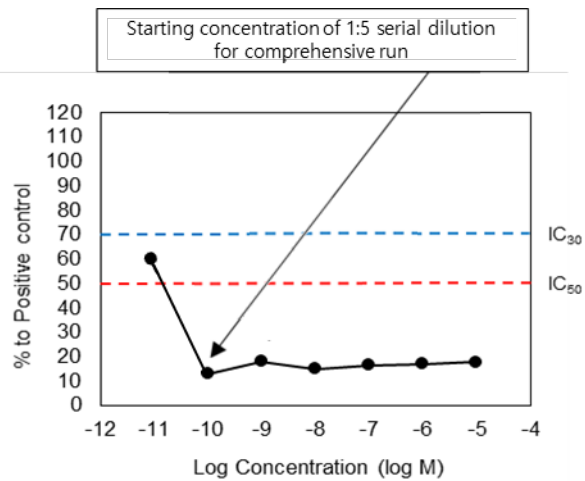
Exemple 5



Exemple 6



Exemple 7



Exemple 8

% to positive control : % par rapport au témoin positif

Log concentration (log M) : Log concentration (log M)

$IC_{30} = CI_{30}$

$IC_{50} = CI_{50}$

Légende exemple 5 : concentration de départ de la dilution en série au 1/3 dans l'épreuve complète

Légende exemples 6, 7 et 8 : concentration de départ de la dilution en série au 1/5 dans l'épreuve complète