

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

### **Ligne directrice axée sur la performance pour les essais *in vitro* faisant appel au récepteur d'œstrogène recombinant humain (hrER) pour la détection des substances ayant une affinité de liaison avec les récepteurs des œstrogènes**

#### **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

##### *Ligne directrice pour les essais axée sur la performance*

1. La présente Ligne directrice pour les essais axée sur la performance (LDAP) décrit la méthodologie des essais *in vitro* faisant appel au récepteur d'œstrogène recombinant humain pour la détection des substances ayant une affinité de liaison avec les récepteurs des œstrogènes (essais de liaison au hrER). Elle comprend deux méthodes d'essai structurellement et fonctionnellement similaires pour détecter les ligands des récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$ ), et doit faciliter l'élaboration de nouvelles méthodes similaires ou modifiées, conformément aux principes de validation exposés dans le document d'orientation de l'OCDE intitulé *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (1). Les méthodes d'essai de référence suivantes (annexes 2 et 3) sont entièrement validées et constituent la base de la présente LDAP :

- Essai de Freyberger-Wilson (FW) : essai *in vitro* de liaison aux récepteurs des œstrogènes (ER) à l'aide d'un ER $\alpha$  humain intégral (2), et
- Essai du Chemical Evaluation and Research Institute (CERI): essai *in vitro* de liaison aux récepteurs des œstrogènes à l'aide du domaine de liaison du ligand d'un ER recombinant humain (2).

Des normes de performance (3) sont disponibles afin de faciliter l'élaboration et la validation de méthodes d'essai similaires visant le même paramètre de sécurité, et de permettre de modifier cette LDAP en temps opportun, en vue d'ajouter de nouvelles méthodes d'essai similaires à la LDAP mise à jour. L'ajout de nouvelles méthodes d'essai similaires n'est toutefois possible qu'après examen et approbation eu égard au respect de ces normes de performance. Chacune des méthodes d'essai incluses dans la présente Ligne directrice est susceptible d'être choisie et mise en œuvre pour répondre aux exigences nationales en matière d'essai de liaison aux ER dans le cadre du système d'acceptation mutuelle de données.

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

2. L'OCDE a lancé en 1998 une activité à caractère hautement prioritaire visant à réviser les lignes directrices existantes ou à établir de nouvelles lignes directrices concernant le dépistage et l'essai des substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien. Le Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens (CC) a été révisé en 2012. Les versions originale et révisée de ce CC figurent en tant qu'annexes dans le document d'orientation sur les Lignes directrices normalisées pour évaluer l'effet perturbateur des produits chimiques sur le système endocrinien (4). Le CC comprend cinq niveaux, chacun d'entre eux correspondant à un degré différent de complexité biologique. Les essais de liaison aux ER décrits dans cette LDAP correspondent au niveau 2, qui couvre « *les essais in vitro fournissant des données sur certains mécanisme(s) et voie(s) d'activité endocrinienne* ». La présente LDAP vise les méthodes d'essai de liaison aux récepteurs *in vitro* conçues pour détecter les ligands du récepteur des œstrogènes alpha (ER $\alpha$ ) chez l'humain.
3. La pertinence de l'essai de liaison aux ER *in vitro* à l'égard des fonctions biologiques a été clairement démontrée. Les essais de liaison aux ER sont conçus pour détecter les produits chimiques susceptibles de perturber les voies d'activité liées à l'hormone œstrogène. Cela fait vingt ans qu'ils sont largement utilisés pour caractériser la distribution tissulaire des ER et pour déterminer les agonistes et les antagonistes de ces récepteurs. Ces essais reposent sur l'interaction ligand-récepteur, qui constitue la première étape de la voie de signalisation des œstrogènes, essentielle aux fonctions reproductives chez l'ensemble des vertébrés.
4. L'interaction des œstrogènes et des ER peut affecter la transcription des gènes régulés par les œstrogènes et avoir des conséquences au-delà du génome en entraînant l'induction ou l'inhibition de processus cellulaires, notamment les mécanismes nécessaires à la prolifération cellulaire, au développement normal du fœtus et aux fonctions reproductives (5) (6) (7). La perturbation des systèmes œstrogéniques normaux pourrait déclencher des troubles du développement (ontogenèse) et nuire à la santé génésique et à l'intégrité du système reproductif. Une mauvaise signalisation des ER peut notamment se traduire par un risque accru de cancer hormonodépendant, des troubles de la fertilité ainsi que des altérations de la croissance et du développement du fœtus (8).
5. Les essais de liaison *in vitro* reposent sur l'interaction directe entre une substance et le domaine de liaison du ligand spécifique d'un récepteur qui régule la transcription d'un gène. L'essai de liaison au récepteur des œstrogènes alpha recombinant humain (hrER $\alpha$ ) consiste principalement à mesurer la capacité d'un ligand radiomarqué (le [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol) à se lier aux ER en présence de concentrations croissantes du produit chimique testé (appelé « compétiteur »). Les produits chimiques d'essai qui présentent une forte affinité de liaison avec les ER entrent en concurrence avec le ligand radiomarqué à une concentration plus faible que les composés ayant une affinité moindre vis-à-vis du récepteur. L'essai comporte deux grands éléments : une expérience de liaison à saturation pour établir les paramètres de l'interaction récepteur-ligand et documenter la spécificité des liaisons aux ER, puis une expérience de liaison compétitive visant à déterminer dans quelle mesure un produit chimique testé fait concurrence à un ligand radiomarqué pour se fixer aux ER.
6. Les études de validation des méthodes de liaison du CERI et de FW ont démontré la pertinence et la fiabilité de ces essais aux fins prévues (2).
7. Les définitions et abréviations utilisées dans cette Ligne directrice pour les essais sont présentées à l'annexe 1.

*Portée et limites des essais de liaison aux récepteurs*

8. Ces méthodes d'essai sont proposées à des fins de dépistage et de priorisation, mais elles peuvent aussi livrer des informations sur l'événement d'initiation moléculaire (EIM) utiles dans le cadre d'une approche fondée sur le poids de la preuve. Elles s'appuient sur l'établissement d'une liaison chimique avec le domaine de liaison du ligand des ER $\alpha$  dans un système *in vitro*. Aussi les résultats obtenus ne doivent-ils pas être directement extrapolés aux mécanismes complexes de signalisation et de régulation qui caractérisent un système endocrinien intact *in vivo*.

9. La liaison du ligand naturel 17 $\beta$ -œstradiol aux ER est la première étape d'une série d'événements moléculaires qui activent la transcription des gènes cibles, et se traduisent *in fine* par un changement physiologique (9). Cet amarrage au domaine de liaison du ligand des ER $\alpha$  est donc considéré comme l'un des mécanismes clés de la perturbation endocrinienne (PE) médiée par les ER, bien que la PE puisse procéder par d'autres mécanismes, notamment : (i) des interactions avec des parties des ER $\alpha$  autres que le site de liaison du ligand, (ii) des interactions avec d'autres récepteurs jouant sur la signalisation des œstrogènes, les ER $\beta$  et les ER couplés aux protéines G ainsi que d'autres récepteurs et systèmes enzymatiques du système endocrinien, (iii) la synthèse hormonale, (iv) l'activation et/ou l'inactivation métaboliques des hormones, (v) la distribution des hormones dans les tissus cibles, et (vi) l'élimination des hormones de l'organisme. Aucune des méthodes d'essai visées par la présente LDAP ne porte sur ces modes d'action.

10. La présente LDAP repose sur la capacité de substances à se lier aux ER $\alpha$  humains, et n'opère pas de distinction entre les agonistes et les antagonistes des ER $\alpha$ . L'essai n'aborde pas non plus les événements déclenchés par cette liaison, comme la transcription des gènes ou les changements physiologiques. Étant donné que l'étude de validation n'a porté que sur des substances isolées, il n'existe aucune information quant à l'applicabilité de l'essai aux mélanges. Cela étant, la méthode d'essai demeure théoriquement applicable à l'évaluation de mélanges ou de substances multi-constituants. Avant de mettre en œuvre la présente Ligne directrice pour les essais sur un mélange afin de dégager des données à des fins réglementaires, il convient d'examiner si, et le cas échéant pourquoi, ladite Ligne directrice peut fournir des résultats adéquats aux fins visées. Ces questions ne se posent pas quand la réglementation exige de réaliser l'essai sur le mélange.

11. Les systèmes de récepteurs hors cellule n'ont intrinsèquement aucune compétence métabolique et n'ont pas été validés en combinaison avec des systèmes enzymatiques métaboliques. Il serait toutefois possible d'intégrer l'activité métabolique dans la conception de l'étude, sous réserve de nouveaux travaux de validation.

12. Concernant les produits chimiques susceptibles de dénaturer les protéines (telles que celles qui constituent le récepteur), comme les tensioactifs, ou les produits chimiques modifiant le pH de la solution d'essai tamponnée, l'essai peut ne pas convenir, ou bien à des concentrations d'essai auxquelles ces interactions n'apparaissent pas. Dans les autres cas, la fourchette de concentrations d'essai d'un produit chimique est plafonnée par sa solubilité dans la solution d'essai tamponnée.

13. À titre d'information, le tableau 1 fournit les résultats des essais des 24 substances testées avec les deux méthodes entièrement validées décrites dans la présente LDAP. Parmi ces substances, 17 sont classées comme ligands des ER et 6 comme non-ligands d'après les rapports publiés, notamment sur les essais *in vitro* d'activation transcriptionnelle et/ou les essais utéro-trophiques (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). S'agissant des données résumées dans le tableau 1, les deux méthodes d'essai ont presque abouti aux mêmes conclusions pour l'ensemble des substances jusqu'à 10<sup>-4</sup>M, et chaque composé a été classé

correctement comme ligand ou non-ligand des ER. D'autres renseignements sur ce groupe de produits chimiques ainsi que sur les substances supplémentaires testées dans les essais de liaison aux ER dans le cadre des études de validation sont fournis dans les normes de performance pour les essais de liaison au hrER (3) à l'annexe 2 (tableaux 1, 2 et 3).

**Tableau 1:** Classification des substances comme ligand ou non-ligand des ER à l'issue d'essais de liaison au hrER d'après les méthodes de FW et du CERI, et comparaison avec la réponse attendue

	Nom de la substance	N° CAS	Réponse attendue	Essai FW		Essai CERI		Classe chimique dans le système MeSH Classe	Classe du produit
				Fourchette de concentrations (M)	Classification	Fourchette de concentrations (M)	Classification		
1	17β-œstradiol (E2)	50-28-2	Ligand	1 x 10 <sup>-11</sup> – 1 x 10 <sup>-6</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-11</sup> – 1 x 10 <sup>-6</sup>	Ligand	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
2	Noréthynodrel	68-23-5	Ligand	3 x 10 <sup>-9</sup> – 30 x 10 <sup>-4</sup>	Ligand	3 x 10 <sup>-9</sup> – 30 x 10 <sup>-4</sup>	Ligand	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
3	Noréthindrone	68-22-4	Ligand	3 x 10 <sup>-9</sup> – 30 x 10 <sup>-4</sup>	Ligand	3 x 10 <sup>-9</sup> – 30 x 10 <sup>-4</sup>	Ligand	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
4	Phtalate de dibutyle	84-74-2	Non-ligand*	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-4</sup>	Non-ligand*†	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-4</sup>	Non-ligand*†	Hydrocarbure (cyclique), ester	Plastifiant, intermédiaire chimique
5	DES	56-53-1	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
6	17α-éthynylœstradiol	57-63-6	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
7	méso-hexestrol	84-16-2	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
8	Génistéine	446-72-0	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Hydrocarbure (hétérocyclique), flavonoïde	Produit naturel
9	Équol	531-95-3	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Métabolite des phytoestrogènes	Produit naturel
10	Butylparabène (n-butyl-4-hydroxybenzoate)	94-26-8	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Paraben	Conservateur
11	Nonylphénol (mélange)	84852-15-3	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Alkylphénol	Composé intermédiaire
12	o,p'-DDT	789-02-6	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Organochlorine	Insecticide
13	Corticostérone	50-22-6	Non-	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-4</sup>	Non-ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-4</sup>	Non-ligand	Stéroïde	Produit naturel
14	Zéaralénone	17924-92-4	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Hydrocarbure (hétérocyclique), lactone	Produit naturel
15	Tamoxifène	10540-29-1	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique et vétérinaire

16	5 $\alpha$ -dihydrotestostérone	521-18-6	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Stéroïde, non phénolique	Produit naturel
17	Bisphénol A	80-05-7	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Phénol	Intermédiaire chimique
18	4- <i>n</i> -heptylphénol	1987-50-4	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Équivoque <sup>a</sup>	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Alkylphénol	Intermédiaire
19	Képone (chlordécone)	143-50-0	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Hydrocarbure (halogéné)	Pesticide
20	Benz(a)anthracène	56-55-3	Non-ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Non-ligand <sup>b</sup>	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Non-ligand <sup>b</sup>	Hydrocarbure aromatique	Intermédiaire
21	Entérolactone	78473-71-9	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Ligand	Phytoestrogène	Produit naturel
22	Progestérone	57-83-0	Non-	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-4</sup>	Non-ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-4</sup>	Non-ligand	Stéroïde	Produit naturel
23	Octyltriéthoxysilane	2943-75-1	Non-ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Non-ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Non-ligand	Silane	Modificateur de surface
24	Atrazine	1912-24-9	Non-ligand*	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-4</sup>	Non-ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-4</sup>	Non-ligand	Composé hétérocyclique	Herbicide

\* Limite de solubilité < 1 x 10<sup>-4</sup> M.

\* L'utilisation et la classification du phtalate de dibutyle (DBP) en tant que non-ligand reposent sur un essai de concentrations allant jusqu'à 10<sup>-4</sup> M, car au cours des études de prévalidation, certains laboratoires ont observé que la substance était insoluble à 10<sup>-3</sup> M (p.ex. apparition d'un trouble).

† Pendant l'étude de validation, le phtalate de dibutyle (DBP) a fait office de substance d'essai codée à des concentrations allant jusqu'à 10<sup>-3</sup> M. Dans ces conditions, certains laboratoires ont observé une baisse des liaisons du ligand radiomarqué à la concentration maximale (10<sup>-3</sup> M) et/ou un ajustement de la courbe incertain. Ces essais ont abouti à la classification du DBP comme « équivoque » ou « ligand » dans les 3/5 des laboratoires utilisant la méthode du CERI et dans les 5/6 des laboratoires appliquant la méthode de FW (voir référence (2), sections IV.B.3a,b et VI.A).

<sup>a</sup> La classification obtenue n'est pas celle qui était attendue. La classification du 4-*n*-heptylphénol comme « équivoque » ou « non-ligand » par les 3/5 des laboratoires a donné lieu en moyenne à une classification en tant qu'équivoque. À y regarder de plus près, il s'avère que ce résultat s'explique par des limites de solubilité chimique qui n'ont pas permis de produire une courbe de liaison complète.

<sup>b</sup> Pendant l'étude de validation, le benz(a)anthracène a été reclassé comme non-ligand (c'est-à-dire négatif) d'après des publications démontrant que l'activité œstrogénique *in vitro* signalée pour cette substance (16) dépend principalement de son activation métabolique (17) (18). Il ne devrait pas y avoir d'activation métabolique enzymatique de cette substance dans les essais de liaison au hrER hors cellule comme ceux de l'étude de validation interlaboratoires. Ainsi, la classification correcte de cette substance est « non-ligand » lorsqu'elle est utilisée dans les conditions expérimentales des essais de FW et du CERI.

## ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE LIAISON AU hrER

### Éléments essentiels de la méthode d'essai

14. La présente LDAP concerne les méthodes faisant appel à un récepteur des œstrogènes et à un ligand de ce récepteur qui présente une affinité de liaison suffisamment forte. Ce ligand doit servir de marqueur ou traceur de l'essai et être remplacé par le produit chimique testé quand la concentration de celui-ci augmente. Les essais de liaison se composent des deux grands éléments suivants : 1) liaison à saturation et 2) liaison compétitive. L'essai de liaison à saturation sert à confirmer la spécificité et l'activité des préparations de récepteurs, tandis que l'essai de liaison compétitive permet d'évaluer la capacité du produit chimique testé à se lier au hrER.

### *Substances témoins*

15. Il convient de détailler pourquoi les témoins et la substance œstrogénique de référence concomitants ont été choisis. L'essai de liaison compétitive requiert, le cas échéant, un témoin avec solvant (véhicule), un témoin positif (ligand des ER ; affinité forte et faible) et un témoin négatif (non-ligand). Ces témoins attestent du bon fonctionnement de la méthode d'essai dans les conditions de l'essai et fournissent des éléments de comparaison d'une expérience à l'autre ; ils font généralement partie des critères d'acceptabilité d'une expérience donnée (1). Pour chaque essai, une même plaque sert à établir les courbes pour toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins (ligand faible et non-ligand). Toutes les autres plaques doivent contenir: 1) une concentration élevée (remplaçant presque entièrement le ligand radiomarqué) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI50) d'E2 et du ligand faible, en triple exemplaire ; 2) des témoins avec solvant et des ligands non spécifiques, chacun en triple exemplaire.

### *Procédures standard de contrôle de qualité*

16. Il convient de suivre les procédures standard de contrôle de qualité décrites pour chaque essai afin de garantir que les récepteurs sont actifs, que les concentrations chimiques sont correctes, que l'intervalle de tolérance reste stable au fil des multiples répliques de l'essai, et que l'essai permet toujours d'établir les liaisons aux ER attendues au fil du temps.

### *Démonstration des compétences du laboratoire*

17. Avant de soumettre des produits chimiques inconnus à l'une des méthodes d'essai traitées dans la présente LDAP, chaque laboratoire devra démontrer qu'il peut la mettre en œuvre en effectuant des essais à saturation pour confirmer la spécificité et l'activité de la préparation de récepteurs ainsi que des essais de liaison compétitive avec la substance œstrogénique de référence et les témoins (ligand faible et non-ligand). Chaque laboratoire doit ainsi créer une base de données compilant les résultats obtenus pour la substance œstrogénique de référence et les témoins à l'issue de 3 à 5 expériences indépendantes qui ne sont pas réalisées le même jour. Ces expériences constituent un fondement historique pour le laboratoire concernant les témoins et la substance œstrogénique de référence, et permettent d'évaluer partiellement l'acceptabilité des futurs essais.

18. La réactivité du système d'essai sera également confirmée en testant les substances d'épreuve de compétence énumérées dans le tableau 2. La liste des substances d'épreuve de compétence constitue une sous-catégorie des substances de référence indiquées dans les normes de performance des essais de liaison aux ER (3). Ces substances sont disponibles dans le commerce, représentent les classes de produits chimiques auxquelles on prête généralement une affinité de liaison aux ER, et manifestent une gamme d'activité correspondant aux affinités attendues pour la liaison aux ER (de faible à forte) ou encore une absence de liaison (négatifs). Pour chaque substance d'épreuve de compétence, les concentrations analysées doivent couvrir la fourchette indiquée dans le tableau 2. Il faut réaliser au moins trois expériences pour chaque substance, dont les résultats doivent correspondre à l'activité chimique attendue. Chaque expérience est réalisée indépendamment en utilisant de nouvelles dilutions du récepteur, des produits chimiques et du réactif, avec trois réplicats par concentration. La compétence est démontrée lorsque chaque substance d'épreuve de compétence est correctement classée (réponse positive/négative). L'épreuve de compétence est effectuée par chaque technicien dans le cadre de la formation à la méthode d'essai.

**Tableau 2 : Liste des témoins et des substances d'épreuve de compétence pour les essais de liaison compétitive au hrER<sup>1</sup>**

N°	Nom de la substance	N° CAS <sup>2</sup>	Réponse attendue <sup>3,4</sup>	Fourchette de concentrations de l'essai (M)	Classe chimique dans le système MeSH <sup>5</sup>	Type de produit <sup>6</sup>
<b>Témoins (substance œstrogénique de référence, ligand faible, non-ligand)</b>						
1	17β-œstradiol	50-28-2	Ligand	1 x 10 <sup>-11</sup> – 1 x 10 <sup>-6</sup>	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
2	Noréthynodrel (ou) Noréthindrone	68-23-5 68-22-4	Ligand	3 x 10 <sup>-9</sup> – 30 x 10 <sup>-6</sup>	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
3	Octyltriéthoxysilane	2943-75-1	Non-ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Silane	Modificateur de surface
<b>Substances d'épreuve de compétence<sup>6</sup></b>						
4	Diéthylstilbestrol	56-53-1	Ligand	1 x 10 <sup>-11</sup> – 1 x 10 <sup>-6</sup>	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
5	17α-éthynylœstradiol	57-63-6	Ligand	1 x 10 <sup>-11</sup> – 1 x 10 <sup>-6</sup>	Stéroïde	Produit pharmaceutique et vétérinaire
6	<i>méso</i> -hexestrol	84-16-2	Ligand	1 x 10 <sup>-11</sup> – 1 x 10 <sup>-6</sup>	Hydrocarbure (cyclique), phénol	Produit pharmaceutique et vétérinaire
7	Tamoxifène	10540-29-1	Ligand	1 x 10 <sup>-11</sup> – 1 x 10 <sup>-6</sup>	Hydrocarbure (cyclique)	Produit pharmaceutique et vétérinaire
8	Génistéine	446-72-0	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Composé hétérocyclique, flavonoïde	Produit naturel
9	Bisphénol A	80-05-7	Ligand	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Phénol	Intermédiaire chimique
10	Zéaralnone	17924-92-4	Ligand	1 x 10 <sup>-11</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Composé hétérocyclique, lactone	Produit naturel
11	Butylparabène	94-26-8	Ligand	1 x 10 <sup>-11</sup> – 1 x 10 <sup>-3</sup>	Acide carboxylique, phénol	Conservateur
12	Atrazine	1912-24-9	Non-ligand	1 x 10 <sup>-11</sup> – 1 x 10 <sup>-6</sup>	Composé hétérocyclique	Herbicide
13	Phtalate de dibutyle (DBP) <sup>7</sup>	84-74-2	Non-ligand <sup>8</sup>	1 x 10 <sup>-10</sup> – 1 x 10 <sup>-4</sup>	Hydrocarbure (cyclique), ester	Plastifiant, intermédiaire chimique
14	Corticostérone	50-22-6	Non-ligand	1 x 10 <sup>-11</sup> – 1 x 10 <sup>-4</sup>	Stéroïde	Produit naturel

<sup>1</sup> Si une substance d'épreuve de compétence n'est plus commercialement disponible, on peut utiliser une substance ayant la même

classification en termes de liaison aux ER ainsi qu'une affinité et une classe chimique comparables.

<sup>2</sup> Abréviation : N° CAS = Numéro d'enregistrement au Chemical Abstracts Service.

<sup>3</sup> Classification comme ligand ou non-ligand des ER $\alpha$  établie à l'issue de l'étude de validation des essais de liaison au hrER du CERI et de FW (2).

<sup>4</sup> L'affinité de liaison aux ER a été établie à partir des Background Review Documents (BRD) de l'ICCVAM relatifs aux essais de liaison aux ER et de TA ER (9) ainsi que des données empiriques et d'autres données tirées des publications parues et examinées (10) (11) (12) (13) (14) (15).

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

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

<sup>7</sup> Le DPB peut également faire office de témoin non ligand, mais à une concentration maximale de  $10^{-4}$  M.

<sup>8</sup> La limite de solubilité de cette substance est  $10^{-4}$  M. L'utilisation et la classification du phtalate de dibutyle (DBP) en tant que non-ligand reposent sur un essai à des concentrations allant jusqu'à  $10^{-4}$  M, car au cours des études de prévalidation, certains laboratoires ont observé que la substance était insoluble à  $10^{-3}$  M (p.ex. apparition d'un trouble).

### ***Détermination de la solubilité et de l'ordre de grandeur des concentrations des produits chimiques testés***

19. Un essai préliminaire est nécessaire pour déterminer la limite de solubilité de chaque produit chimique testé ainsi que la fourchette de concentrations qui convient pour l'essai. La limite de solubilité de chaque produit chimique testé doit d'abord être déterminée dans le solvant, puis confirmée dans les conditions de l'essai. La concentration finale utilisée dans l'essai ne doit pas dépasser 1 mM. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur s'effectue à l'aide d'un témoin avec solvant et d'une série logarithmique de huit dilutions de la concentration maximale acceptable (p.ex. 1 mM ou moins, selon la limite de solubilité). On relèvera l'apparition d'un trouble ou d'un précipité, le cas échéant. Il faut ajuster les concentrations des deuxième et troisième expériences de façon à mieux caractériser la courbe concentration-réponse.

### ***Critères d'acceptabilité de l'essai***

20. L'acceptation ou le rejet d'un essai dépend de l'évaluation des résultats obtenus avec la substance œstrogénique de référence et les témoins utilisés pour chaque expérience. Il faut d'abord que pour la première plaque, les courbes concentration-réponse complètes obtenues pour les substances de référence de chaque expérience correspondent aux mesures de la performance fondées sur les paramètres d'ajustement des courbes (p.ex. CI50 et pente de Hill) découlant des résultats des méthodes d'essai du CERI et du FW, respectivement (annexes 2 et 3), et des données historiques concernant les témoins dont dispose le laboratoire qui réalise l'essai. Tous les témoins (substance œstrogénique de référence, ligand faible et non-ligand) doivent être classés correctement à l'issue de chaque expérience. Ensuite, les témoins de toutes les plaques suivantes doivent livrer des résultats concordants avec ceux de la première plaque. Il convient d'analyser une fourchette de concentrations du produit chimique testé suffisante pour définir clairement le sommet de la courbe de liaison compétitive. La variabilité entre les réplicats de chaque concentration du produit chimique testé et entre les trois essais indépendants doit rester raisonnable et défendable sur le plan scientifique. Un laboratoire prouve sa compétence à répéter une méthode d'essai de manière homogène en établissant et en entretenant une base de données compilant les résultats historiques pour la substance œstrogénique de référence et les témoins. Les écarts-types (ET) ou coefficients de variation (CV) des moyennes des paramètres d'ajustement des courbes de la substance œstrogénique de référence et du ligand faible témoin obtenues après plusieurs expériences peuvent servir à mesurer la reproductibilité intra-laboratoire. Un avis professionnel s'impose pour analyser les résultats des témoins de la plaque pour chaque essai et pour chaque produit chimique testé.

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

- Les données doivent être suffisantes pour évaluer quantitativement la liaison aux ER.
- Les concentrations testées doivent rester inférieures à la limite de solubilité du produit chimique testé.

### *Analyse des données*

21. La procédure d'analyse définie pour les résultats des essais de liaison à saturation et de liaison compétitive doit être conforme aux principes fondamentaux de caractérisation des interactions ligand-récepteur. Les données de liaison à saturation sont généralement analysées en appliquant un modèle de régression non linéaire fondé sur les liaisons totale et non spécifique. Il peut s'avérer nécessaire d'effectuer une correction du fait de la perte de ligand (p.ex. Swillens, 1995(19)) pour déterminer la capacité maximale de liaison  $B_{max}$  et la constante de liaison  $K_d$ . Dans les essais de liaison compétitive, les données sont typiquement transformées (p.ex. pourcentage de liaison spécifique, logarithme de la concentration de produit chimique testé). Les  $\log(CI_{50})$  de chaque produit chimique testé sont estimés grâce à un logiciel d'ajustement des courbes par régression non linéaire approprié se fondant sur une équation de Hill à quatre paramètres. Après une première analyse, les paramètres d'ajustement des courbes sont déterminés, puis on vérifie visuellement si les données de liaison correspondent à la courbe de liaison compétitive obtenue. Une analyse supplémentaire est parfois nécessaire en vue d'obtenir un ajustement des courbes optimal, par exemple en resserrant le sommet et la base de la courbe ou en appliquant la règle des 10 % (voir annexe 4 et référence 2, Section III.A.2).

22. Le respect des critères d'acceptabilité (paragraphe 20) indique que le système d'essai fonctionne correctement, mais ne garantit pas que chaque essai lancé fournira des données exactes. La réplication des résultats corrects du premier essai constitue la meilleure indication que les valeurs obtenues sont exactes.

### *Critères généraux d'interprétation des données*

23. Il n'existe actuellement aucune méthode d'interprétation des données d'essai de liaison aux ER universellement reconnue. Cependant, les évaluations qualitatives (p.ex. ligand ou non-ligand) et/ou quantitatives (p.ex.  $CI_{50}$ , affinité de liaison relative [ALR]) de l'activité médiée par les hrER doivent s'appuyer sur des données empiriques et des raisonnements scientifiques solides.

### *Rapport d'essai*

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

Méthode d'essai :

- méthode d'essai employée.

Témoins/substance de référence/produit chimique testé

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

ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant :

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

Substance multi-constituants, UVBC et mélanges :

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

Solvant/Véhicule :

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

Récepteurs :

- source des récepteurs (fournisseur, numéro de référence, lot, type de récepteur, concentration de récepteurs actifs indiquée par le fournisseur, certification du fournisseur) ;
- caractérisation des récepteurs (y compris les résultats des essais de liaison à saturation) :  $K_d$ ,  $B_{max}$  ;
- stockage des récepteurs.

Ligand radiomarqué :

- fournisseur, numéro de référence, lot, activité spécifique.

Conditions de l'essai :

- limites de solubilité dans les conditions de l'essai ;
- composition de la solution tamponnée de l'essai de liaison ;
- concentration de récepteur ;
- concentration de traceur (p.ex. ligand radiomarqué) ;
- concentrations de produit chimique testé ;
- pourcentage de véhicule dans l'essai final ;
- température et durée d'incubation ;
- méthode de séparation des ligands liés et libres ;
- témoins et produits chimiques positifs et négatifs de référence ;
- critères d'interprétation des résultats positif, négatif ou équivoque.

Vérification de l'acceptabilité :

- valeurs réelles des  $CI_{50}$  et pentes de Hill pour les témoins positifs et produits chimiques de référence inclus dans l'essai de liaison compétitive.

Résultats

- données brutes, données sur les ligands liés ou libres ;

- vérification de la dénaturation, s'il y a lieu ;
- concentration minimale avec effet (CME), le cas échéant ;
- ALR et/ou  $CI_{50}$ , le cas échéant ;
- relation concentration-réponse, si possible ;
- analyses statistiques, le cas échéant, ainsi qu'une mesure de l'erreur et de la confiance (p.ex. erreur-type de la moyenne, écart-type, CV ou IC 95 %) et description de la façon dont ces données ont été obtenues.

#### Discussion des résultats

- application de la règle des 10 %.

#### Conclusion

**BIBLIOGRAPHIE**

- 1) OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Publications du programme Environnement, santé et sécurité, Série sur les Essais et Evaluations (No.34.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 2) OCDE (2015), Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ), Publications du programme Environnement, santé et sécurité, Série sur les Essais et Evaluations (No.226), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 3) OCDE (2015), Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ), Publications du programme Environnement, santé et sécurité, Série sur les Essais et Evaluations (No.222), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 4) OCDE (2012), Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, Série sur les Essais et Evaluations (No.150), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 5) Cavailles V. (2002), Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, *Climacteric*, 5 suppl. 2 : p. 20-6.
- 6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: what are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4) : p. 1073-89.
- 7) Younes M. et Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135(1):p. 63-6.
- 8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement, *Endo Rev* 30(4) : p. 293-342.
- 9) ICCVAM (2002), Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No. 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- 10) ICCVAM (2003), ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- 11) ICCVAM (2006), ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

- 12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1) : p. 225-231.
- 13) OCDE (2007), Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Publications du programme Environnement, santé et sécurité, Série sur les Essais et Evaluations (No. 67), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI, Japon) : p. 1-188.
- 15) Yamasaki, K.; Noda, S. ; Imatanaka, N. ; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Tox Letters*, 146: p. 111-120.
- 16) Kummer, V. ; Maskova, J. ; Zraly, Z. ; Neca, J. ; Simeckova, P. ; Vondracek, J. ; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicology Letters*, 180 : p. 213-221.
- 17) Gozgit, J.M. ; Nestor, K.M. ; Fasco, M.J. ; Pentecost, B.T. ; Arcaro, K.F. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196: p. 58-67.
- 18) Santodonato J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34 : p. 835-848.
- 19) Swillens S (1995), Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis. *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

**ANNEXE 1**

## Définitions et abréviations

**Activité œstrogénique** : capacité d'un produit chimique à reproduire la capacité du 17 $\beta$ -œstradiol à se fixer aux récepteurs des œstrogènes. La présente LDAP permet de détecter les liaisons au hrER $\alpha$ .

**ALR** : affinité de liaison relative. L'ALR d'une substance est exprimée en pourcentage à partir du rapport entre le log(CI<sub>50</sub>) de la substance et le log(CI<sub>50</sub>) du 17 $\beta$ -œstradiol.

**CC** : Cadre conceptuel de l'OCDE pour le dépistage et l'essai des substances susceptibles d'avoir des effets perturbateurs sur le système endocrinien.

**CI<sub>50</sub>** : concentration efficace du produit chimique testé induisant la moitié de l'inhibition maximale.

**CME (Concentration minimale avec effet)** : concentration la plus faible du produit chimique testé induisant une réponse (soit la concentration la plus faible du produit chimique testé pour laquelle le nombre d'inductions est statistiquement différent de celui du témoin avec véhicule concomitant).

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

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

**CV** : coefficient de variation.

**E2** : 17 $\beta$ -œstradiol.

**ER** : *estrogen receptor* (récepteur des œstrogènes).

**ET** : écart-type.

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

**hER $\alpha$**  : récepteur des œstrogènes alpha humain.

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

**LDAP** : Ligne directrice pour les essais axée sur la performance.

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

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

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

**PE** : perturbation endocrinienne.

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

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

**Règle des 10 %** : possibilité d'exclure des points de données des analyses lorsque le pourcentage de liaison spécifique moyen du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol pour tous les réplicats d'une concentration dépasse de 10 % ou plus la moyenne correspondant à une concentration inférieure (voir annexe 4).

**Réplique d'essai** : méthode d'essai structurellement et fonctionnellement similaire à une méthode de référence validée et acceptée. Synonyme de méthode d'essai similaire.

**Reproductibilité inter-laboratoires** : mesure du degré auquel différents laboratoires qualifiés qui emploient le même protocole et testent les mêmes substances peuvent produire des résultats similaires en termes de qualité et de quantité. La reproductibilité inter-laboratoires est déterminée au cours des processus de prévalidation et de validation, et indique dans quelle mesure un essai peut être transféré sans problème entre laboratoires. Elle est parfois désignée par reproductibilité entre laboratoires (1).

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

**Substance œstrogénique de référence** : 17β-œstradiol (E2, CAS 50-28-2).

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

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

**ANNEXE 2****Protocole de Freyberger et Wilson relatif aux essais *in vitro* de liaison à saturation et de liaison compétitive aux récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$ ) faisant appel à un ER $\alpha$  recombinant intégral****REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES** (Voir aussi **INTRODUCTION GÉNÉRALE**, page 1)

1. Cette méthode d'essai *in vitro* de liaison à saturation et de liaison compétitive aux récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$ ) fait appel au récepteur des œstrogènes alpha humain intégral (hrER $\alpha$ ) produit et isolé à partir de cellules d'insectes infectées à l'aide d'un baculovirus. Le protocole mis au point par Freyberger et Wilson a fait l'objet d'une étude de validation internationale réalisée par plusieurs laboratoires (2). Cette étude a démontré la pertinence et la fiabilité de cette méthode aux fins prévues.
2. La présente méthode d'essai constitue une procédure de dépistage visant à détecter les substances qui peuvent se lier au hrER $\alpha$  intégral. Elle permet de déterminer la capacité d'un produit chimique testé à former les liaisons avec le hrER $\alpha$  en concurrence avec le 17 $\beta$ -œstradiol. Sur le plan quantitatif, l'essai peut livrer les résultats suivants : la CI50, soit la concentration de produit chimique testé nécessaire pour remplacer la moitié du [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol lié au hrER $\alpha$ , et les affinités de liaison relatives (ALR) vis-à-vis du hrER $\alpha$  des produits chimiques testés par rapport au 17 $\beta$ -œstradiol. L'essai visant à dépister les produits chimiques, les résultats acceptables sur le plan qualitatif sont la classification des produits chimiques testés soit comme ligand ou non-ligand du hrER $\alpha$ , soit comme équivoque, en fonction de critères définis à partir des courbes de liaison.
3. Étant donné que la méthode d'essai fait appel à un ligand radiomarqué, le laboratoire doit disposer d'une autorisation de manipuler des matériaux radioactifs. Toutes les procédures qui impliquent des isotopes radioactifs ou des produits chimiques dangereux doivent être conformes aux réglementations et aux procédures établies par la législation nationale.
4. Il convient de lire les parties « **INTRODUCTION GÉNÉRALE** » et « **ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE LIAISON AU hrER** » (pages 1 à 14) avant de mettre en œuvre la présente méthode d'essai à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette Ligne directrice sont indiquées à l'[annexe 1](#).

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

5. L'essai de liaison au hrER $\alpha$  repose principalement sur la mesure de la capacité d'un ligand radiomarqué ([<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol) à se lier aux ER en présence de concentrations croissantes de produit chimique testé (appelé « compétiteur »). Les produits chimiques testés qui présentent une forte affinité de liaison avec les ER entrent en concurrence avec le ligand radiomarqué à une concentration plus faible que les composés ayant une affinité moindre vis-à-vis du récepteur.
6. L'essai comporte deux grands éléments : une expérience de liaison à saturation pour établir les paramètres de l'interaction récepteur-ligand, puis une expérience de liaison compétitive visant à déterminer dans quelle mesure un produit chimique testé fait concurrence à un ligand radiomarqué pour se lier aux ER.

7. L'objectif de l'expérience de liaison à saturation est de caractériser le nombre et l'affinité de liaison des récepteurs dans un lot donné, dans la perspective de l'essai de liaison compétitive. L'expérience de liaison à saturation permet de mesurer, à l'équilibre, l'affinité d'une concentration fixe de récepteurs des œstrogènes vis-à-vis de leur ligand naturel (représentée par la constante de dissociation  $K_d$ ), ainsi que la concentration de sites récepteurs actifs ( $B_{max}$ ).

8. L'expérience de liaison compétitive détermine l'affinité d'une substance à se lier aux ER en concurrence avec le [ $^3$ H]-17 $\beta$ -œstradiol. Cette affinité est quantifiée par la concentration de produit chimique testé qui, à l'équilibre, inhibe 50 % des liaisons spécifiques du [ $^3$ H]-17 $\beta$ -œstradiol, appelée « concentration induisant 50 % d'inhibition » ou  $CI_{50}$ ). Elle peut aussi s'exprimer par l'affinité de liaison relative (ALR, calculée par rapport à la  $CI_{50}$  de l'œstradiol mesurée séparément lors du même essai). L'expérience de liaison compétitive mesure la liaison aux ER du [ $^3$ H]-17 $\beta$ -œstradiol en concentration fixe en présence d'une large fourchette (huit ordres de grandeur) de concentrations du produit chimique testé. Les données sont ensuite ajustées, quand c'est possible, à une forme de l'équation de Hill (Hill, 1910) décrivant le remplacement du ligand radiomarqué par un compétiteur sur un site unique. L'ampleur du remplacement du ligand radiomarqué œstradiol à l'équilibre permet alors de caractériser le produit chimique testé comme ligand, non-ligand ou équivoque.

## MODE OPÉRATOIRE

### Démonstration de l'acceptabilité de la performance de la protéine hrER $\alpha$

9. Avant d'effectuer de manière routinière les essais de liaison à saturation et de liaison compétitive, il faut vérifier que chaque nouveau lot de hrER $\alpha$  fonctionne correctement dans le laboratoire où il doit être utilisé. Cette démonstration de la performance repose sur un processus en deux étapes :

- Essai de liaison à saturation avec du [ $^3$ H]-17 $\beta$ -œstradiol pour démontrer la saturation et la spécificité vis-à-vis du hrER $\alpha$ . Une analyse de régression non linéaire des données obtenues (p.ex. BioSoft ; McPherson, 1985 ; Motulsky, 1995) permettant d'obtenir une représentation de Scatchard, livrera l'affinité de liaison au hrER $\alpha$  du [ $^3$ H]-17 $\beta$ -œstradiol ( $K_d$ ) ainsi que le nombre de récepteurs actifs ( $B_{max}$ ), pour chaque lot de hrER $\alpha$ .
- Essai de liaison compétitive avec les substances témoins (substance œstrogénique de référence [17 $\beta$ -œstradiol], ligand faible [noréthynodrel ou noréthindrone] et non-ligand [octyltriéthoxysilane, OTES]). Chaque laboratoire est tenu de créer une base de données historiques visant à documenter que la  $CI_{50}$  et d'autres valeurs pertinentes relatives à la substance œstrogénique de référence et au ligand faible restent cohérentes d'une expérience à l'autre et d'un lot de hrER $\alpha$  à l'autre. Il faut que les paramètres des courbes de liaison compétitive obtenus pour les substances témoins demeurent dans les limites de l'intervalle de confiance à 95 % (voir tableau 1) déterminées grâce aux données des laboratoires participant à l'étude de validation de l'essai (2).

**Tableau 1. Critères de performance établis pour la substance œstrogénique de référence et le ligand faible dans l'essai de liaison au hrER de FW**

Substance	Paramètre	Moyenne <sup>a</sup>	Écart-type (n)	Intervalle de confiance à 95 % <sup>b</sup>	
				Limite minimale	Limite maximale
<b>17β-œstradiol</b>	Sommet (%)	100.44	10.84 (67)	97.8	103.1
	Base (%)	0.29	1.25 (67)	-0.01	0.60
	Pente de Hill	-1.06	0.20 (67)	-1.11	-1.02
	LogCI <sub>50</sub> (M)	-8.92 <sup>c</sup>	0.18 (67)	-8.97	-8.88
<b>Noréthynodrel</b>	Sommet (%)	99.42	8.90 (68)	97.27	101.60
	Base (%)	2.02	3.42 (68)	1.19	2.84
	Pente de Hill	-1.01	0.38 (68)	-1.10	-0.92
	LogCI <sub>50</sub> (M)	-6.39	0.27 (68)	-6.46	-6.33
<b>Noréthindrone<sup>c</sup></b>	Sommet (%)	96.14	8.44 (27)	92.80	99.48
	Base (%)	2.38	5.02 (27)	0.40	4.37
	Pente de Hill	-1.41	0.32 (27)	-1.53	-1.28
	LogCI <sub>50</sub> (M)	-5.73	0.27 (27)	-5.84	-5.62

<sup>a</sup> Les valeurs moyenne (n) ± écart-type (ET) ont été calculées à partir d'estimations des paramètres d'ajustement des courbes (équation de Hill à quatre paramètres) issus des essais sur les témoins réalisés par quatre laboratoires dans le cadre de l'étude de validation (voir annexe N de la référence 2).

<sup>b</sup> Les intervalles de confiance à 95 % sont fournis à titre d'orientation pour les critères d'acceptabilité.

<sup>c</sup> L'essai avec la noréthindrone était optionnel pour le volet IV de l'étude de validation (voir référence 2, Subtask IV). Ainsi, les valeurs moyenne ± ET (n) ont été calculées grâce aux estimations des paramètres d'ajustement des courbes (équation de Hill à quatre paramètres) issus des essais sur les témoins réalisés par deux laboratoires.

La gamme des CI<sub>50</sub> dépendra de la K<sub>d</sub> de la préparation de récepteurs et de la concentration du ligand radiomarqué utilisée par chaque laboratoire. Il est admis d'effectuer les ajustements appropriés pour la fourchette des CI<sub>50</sub> en fonction des conditions de mise en œuvre de la méthode d'essai.

### Démonstration des compétences du laboratoire

10. Voir les paragraphes 17 et 18 ainsi que le tableau 2 de la partie « ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE LIAISON AU hrER » de la présente Ligne directrice pour les essais. Chaque essai (liaison à saturation et liaison compétitive) se compose de trois essais indépendants (utilisant de nouvelles dilutions du récepteur, des produits chimiques et des réactifs) réalisés trois jours différents, chacun d'entre eux comportant trois réplicats.

**Détermination de la concentration de récepteur (hrER $\alpha$ )**

11. La concentration de récepteurs actifs varie légèrement en fonction des lots et des conditions de stockage. C'est pourquoi il convient de déterminer la concentration de récepteurs actifs du lot livré par le fournisseur. Cette étape permet d'obtenir la concentration exacte de récepteurs actifs au moment de l'essai.

12. Dans les mêmes conditions que l'essai de liaison compétitive, donc en présence de [ $^3\text{H}$ ]-œstradiol à 1 nM, des concentrations nominales de 0.25, 0.5, 0.75 et 1 nM de récepteur sont incubées en absence (liaison totale) et en présence (liaison non spécifique) d'œstradiol non marqué à 1  $\mu\text{M}$ . La liaison spécifique est calculée en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale, puis reportée graphiquement en fonction de la concentration nominale de récepteur. La concentration de récepteur pour laquelle la liaison spécifique correspond à 20 % du ligand radiomarqué ajouté permet de déduire la concentration nominale de récepteur. C'est cette dernière qui est utilisée pour les expériences de liaison à saturation et de liaison compétitive. Souvent, cette condition sera remplie par une concentration finale de hrER de 0.5 nM.

13. Si le critère des 20 % échoue à plusieurs reprises, il faut chercher d'éventuelles erreurs dans le montage expérimental. L'incapacité à satisfaire le critère des 20 % peut suggérer que le lot de récepteurs recombinants contient très peu de sites actifs ; il faut alors envisager d'employer un autre lot.

**Essai à saturation**

14. Huit concentrations croissantes de [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol sont évaluées en triple exemplaire en respectant les trois conditions suivantes (voir tableau 2) :

- a. En absence de 17 $\beta$ -œstradiol non marqué et en présence d'ER. Cette condition permet de déterminer la liaison totale en mesurant la radioactivité des puits ne contenant que le [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol.
- b. En présence d'une concentration de 17 $\beta$ -œstradiol non marqué mille fois plus importante que celle du 17 $\beta$ -œstradiol radiomarqué et en présence d'ER. Cette condition vise à saturer les sites de liaison actifs avec le 17 $\beta$ -œstradiol non marqué et à déterminer la liaison non spécifique déduite de la radioactivité des puits. En effet, on considère que le reste d'œstradiol chaud (radiomarqué) capable de se lier au récepteur se fixe sur des sites non spécifiques, car l'œstradiol froid (non marqué) doit être en tel excès qu'il occupe tous les sites spécifiques disponibles sur les récepteurs.
- c. En absence de 17 $\beta$ -œstradiol non marqué et en absence d'ER (détermination de la radioactivité totale).

*Préparation des solutions de [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol et de 17 $\beta$ -œstradiol non marqué*

15. Les dilutions de [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol sont préparées en ajoutant la solution d'essai tamponnée à une solution mère de [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol à 12 nM afin d'obtenir des concentrations allant d'abord de 0.12 à 12 nM. Les concentrations finales de l'essai, qui vont de 0.03 à 3.0 nM, sont obtenues en ajoutant 40  $\mu\text{L}$  des dilutions précédentes dans chaque puits d'essai d'une plaque microtitre 96 puits, pour un volume final de 160  $\mu\text{L}$  par puits. La préparation de la solution d'essai tamponnée, de la solution mère et des dilutions de [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol ainsi que la détermination des concentrations sont décrites en détail dans le protocole de FW (2).

16. Les dilutions des solutions éthanoliques de 17 $\beta$ -œstradiol sont préparées par ajout de solution d'essai tamponnée de façon à obtenir huit concentrations croissantes allant d'abord de 0.06 à 6  $\mu\text{M}$ . Les

concentrations finales de l'essai, de 0.03 à 3.0 µM, sont obtenues en ajoutant 80 µL des dilutions précédentes dans chaque puits d'essai d'une plaque microtitre 96 puits, pour un volume final de 160 µL par puits. La concentration finale de 17β-œstradiol non marqué dans chaque puits d'essai de liaison non spécifique doit être mille fois supérieure à celle du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol. La préparation des dilutions de 17β-œstradiol non marqué est décrite en détail dans le protocole de FW (2).

17. C'est la concentration nominale de récepteur pour laquelle on obtient une liaison spécifique de 20 ± 5 % qui est utilisée pour l'essai (voir paragraphes 12-13). La solution de hrERα doit être préparée immédiatement avant emploi.

18. Les plaques microtitre 96 puits sont préparées conformément au tableau 2, avec 3 réplicats par concentration. L'appendice 2 présente un exemple de plaque indiquant la concentration et la distribution des volumes par puits du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol, du 17β-œstradiol non marqué, de la solution tamponnée et du récepteur.

**Tableau 2 : Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison à saturation**

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	
<b>A</b>	0.03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			0.06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			0.08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			0.10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			Liaison totale (solvant)
<b>B</b>	0.30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			0.60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			1.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			3.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			
<b>C</b>													
<b>D</b>	0.03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.03 µM E <sub>2</sub>			0.06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.06 µM E <sub>2</sub>			0.08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.08 µM E <sub>2</sub>			0.10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.10 µM E <sub>2</sub>			Liaison non spécifique
<b>E</b>	0.30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.30 µM E <sub>2</sub>			0.60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.60 µM E <sub>2</sub>			1.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 1.0 µM E <sub>2</sub>			3.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 3.0 µM E <sub>2</sub>			
<b>F</b>													
<b>G</b>													
<b>H</b>													

[<sup>3</sup>H] E<sub>2</sub> : [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol

ER : *estrogen receptor* (récepteur des œstrogènes)

E<sub>2</sub> : 17β-œstradiol non marqué

19. Les plaques d'essai microtitre sont placées sur un rotateur et incubées entre 2 et 8 °C pendant 16 à 20 heures.

*Mesure du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol lié au hrERα*

20. Pour séparer le [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol lié au hrERα du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol libre, 80 µL d'une suspension froide de DCC sont d'abord ajoutés dans chaque puits, puis les plaques microtitre sont agitées pendant 10 minutes, et enfin centrifugées pendant 10 minutes à 2 500 tours/min environ. Afin de minimiser la dissociation du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol lié au hrERα pendant ce processus, il est extrêmement important que les solutions tamponnées et les puits d'essai soient maintenus entre 2 et 8 °C et d'enchaîner rapidement les étapes du processus. Un agitateur pour plaques microtitre est nécessaire pour un traitement efficace et rapide.

21. Les 50 µL de surnageant comprenant le [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol lié au hrERα sont alors prélevés très

soigneusement pour éviter de contaminer les puits par contact avec le DCC, puis placés dans une deuxième plaque microtitre.

22. Chaque puits de cette plaque (de A1 à B12 et de D1 à E12) reçoit ensuite 200 µL de scintillateur liquide capable de convertir l'énergie cinétique du rayonnement nucléaire en énergie lumineuse. Les puits G1-H12 (correspondant aux désintégrations par minute - dpm - totales) représentent les dilutions successives du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol (40 µL) qui doivent être versées directement dans les puits de la plaque de mesure contenant le scintillateur liquide, comme le montre le tableau 3. Ces puits ne contiennent donc que 200 µL de scintillateur liquide et la dilution appropriée de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol. Ils indiquent la quantité de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol (exprimée en dpm) ajoutée à chaque série de puits pour la liaison totale et la liaison non spécifique.

**Tableau 3 : Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison à saturation, mesure de la radioactivité**

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	
<b>A</b>	0.03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER		0.06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			0.08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			0.10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			Liaison totale (solvant)	
<b>B</b>	0.30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER		0.60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			1.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER			3.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER				
<b>C</b>													
<b>D</b>	0.03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.03 µM E <sub>2</sub>		0.06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.06 µM E <sub>2</sub>			0.08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.08 µM E <sub>2</sub>			0.10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.10 µM E <sub>2</sub>			Liaison non spécifique	
<b>E</b>	0.30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.30 µM E <sub>2</sub>		0.60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 0.60 µM E <sub>2</sub>			1.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 1.0 µM E <sub>2</sub>			3.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> + ER + 3.0 µM E <sub>2</sub>				
<b>F</b>													
<b>G</b>	0.03 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub> (total en dpm)		0.06 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>			0.08 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>			0.10 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>			Total en dpm*	
<b>H</b>	0.30 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>		0.60 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>			1.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>			3.0 nM [ <sup>3</sup> H] E <sub>2</sub>				

[<sup>3</sup>H] E<sub>2</sub> : [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol

ER : *estrogen receptor* (récepteur des œstrogènes)

E<sub>2</sub> : 17β-œstradiol non marqué

dpm : désintégrations par minute

\* Les dilutions en série d'œstradiol tritié (chaud) sont ajoutées directement aux 200 µL de scintillateur liquide contenus dans les puits G1 à H12.

23. La mesure de la scintillation commence au moins deux heures après l'ajout, et dure 40 minutes par puits. Les désintégrations par minute par puits (dpm/puits) sont déterminées grâce à un compteur à scintillation pour plaque microtitre, en appliquant une correction de l'extinction. Il est aussi possible, à défaut de compteur à scintillation pour plaque microtitre, d'analyser les échantillons à l'aide d'un compteur classique. Dans ce cas, il est envisageable de raccourcir la durée de mesure.

### Essai de liaison compétitive

24. L'essai de liaison compétitive mesure les liaisons du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol en concentration fixe en présence de concentrations croissantes de produit chimique testé. Il requiert trois réplicats simultanés pour chaque concentration. En outre, trois essais non simultanés sont réalisés pour chaque produit chimique testé. L'essai nécessite au moins une plaque microtitre 96 puits.

#### *Témoins*

25. Le solvant et les témoins concomitants (substance œstrogénique de référence, ligand faible et non-ligand) doivent être inclus dans chaque expérience de l'essai. Pour chaque essai, une même plaque sert à établir les courbes pour toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins (ligand faible et non-ligand). Toutes les autres plaques doivent contenir (i) une concentration élevée (remplacement maximal) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI<sub>50</sub>) d'E2 et du ligand faible, en triple exemplaire ; (ii) le témoin avec solvant et des ligands non spécifiques, avec au moins trois réplicats respectivement. Les procédures de préparation de la solution d'essai tamponnée, des solutions du produit chimique testé, des témoins, de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol et du hrERα sont décrites dans la référence 2 (annexe K, voir le protocole d'essai de FW).

#### *- Témoin avec solvant :*

26. Le témoin avec solvant confirme que ce dernier n'interagit pas avec le système d'essai et permet de mesurer la liaison totale (LT). De préférence, on choisira l'éthanol comme solvant. Si la concentration maximale du produit chimique testé n'est pas soluble dans l'éthanol, il est aussi possible d'avoir recours au DMSO. À la fin de l'essai, la concentration finale d'éthanol ou de DMSO, le cas échéant, s'élèvera à 1.5 % par puits d'essai, et ne devra pas dépasser 2 %.

#### *- Témoin avec solution tamponnée :*

27. Le témoin avec solution tamponnée (TST) contient tous les éléments de l'essai sauf le solvant et le produit chimique testé. Les résultats du TST sont comparés à ceux obtenus pour le témoin avec solvant afin de vérifier que le solvant utilisé ne perturbe pas le système d'essai.

#### *- Ligand fort (substance œstrogénique de référence)*

28. Le 17β-œstradiol (CAS 50-28-2) est le ligand endogène qui présente une forte affinité de liaison aux ER de type alpha. Il convient de tracer une courbe de référence pour le 17β-œstradiol non marqué pour chaque essai de liaison compétitive au hrERα, afin d'évaluer la variabilité des essais répétés au fil du temps dans le même laboratoire. Huit solutions de 17β-œstradiol non marqué sont préparées dans l'éthanol, les concentrations d'essai allant de 100 nM à 10 pM (de -7[logM] à -11[logM]), avec les intervalles suivants : -7[logM], -8[logM], -8.5[logM], -9[logM], -9.5[logM], -10[logM] et -11[logM]). La concentration maximale de 17β-œstradiol non marqué (1 μM) sert également d'indicateur de liaison non spécifique (LNS). Cette concentration est donc distinguée par la mention « LNS » dans le tableau 4, même si elle fait également partie de la courbe de référence.

#### *- Ligand faible*

29. Un ligand faible (noréthynodrel [CAS 68-23-5] ou noréthindrone [CAS 68-22-4]) est inclus pour démontrer la sensibilité de chaque expérience et évaluer la variabilité au fil des répétitions de l'essai. Huit solutions de ligand faible sont préparées dans l'éthanol, avec des concentrations d'essai allant de 3 nM à

30  $\mu\text{M}$  (de  $-8.5[\log\text{M}]$  à  $-4.5[\log\text{M}]$ ), avec les intervalles suivants :  $-4.5[\log\text{M}]$ ,  $-5[\log\text{M}]$ ,  $-5.5[\log\text{M}]$ ,  $-6[\log\text{M}]$ ,  $-6.5[\log\text{M}]$ ,  $-7[\log\text{M}]$ ,  $-7.5[\log\text{M}]$  et  $-8.5[\log\text{M}]$ .

*- Non-ligand*

30. On fera appel à l'octyltriéthoxysilane (OTES, CAS 2943-75-1) comme témoin négatif (non-ligand). Ce composé permet de vérifier que tel qu'il est mis en œuvre, l'essai détermine les produits chimiques testés qui ne se lient pas au hrER $\alpha$ . Huit solutions de non-ligand sont préparées dans l'éthanol, avec des concentrations d'essai allant de 0.1 nM à 1 000  $\mu\text{M}$  (de  $-10[\log\text{M}]$  à  $-3[\log\text{M}]$ ), les intervalles étant définis par incrémentation logarithmique. Il est aussi possible d'utiliser à la place le phtalate de dibutyle (DBP) comme témoin non-ligand. Sa solubilité maximale s'élève à  $-4[\log\text{M}]$ .

*Concentration de hrER $\alpha$*

31. C'est la quantité de récepteur pour laquelle on obtient une liaison spécifique de  $20 \pm 5\%$  du ligand radiomarqué à 1 nM qui est utilisée pour l'essai (voir paragraphes 12-13 de l'annexe 2). La solution de hrER $\alpha$  doit être préparée immédiatement avant emploi.

*[ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol*

32. La concentration de [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol dans les puits d'essai doit être 1.0 nM.

*Produits chimiques testés*

33. Un premier essai s'impose pour déterminer la limite de solubilité de chaque produit chimique testé ainsi que la fourchette de concentrations qui convient pour l'essai. La limite de solubilité de chaque produit chimique testé doit d'abord être déterminée dans le solvant, puis confirmée dans les conditions de l'essai. La concentration finale utilisée dans l'essai ne doit pas dépasser 1 mM. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur s'effectue à l'aide d'un témoin avec solvant et d'une série logarithmique de huit dilutions de la concentration maximale acceptable (p.ex. 1 mM ou moins, selon la limite de solubilité). On relève alors l'apparition d'un trouble ou d'un précipité, le cas échéant (voir aussi le paragraphe 35). Le produit chimique testé est analysé grâce aux courbes obtenues pour la série logarithmique de huit concentrations établie par l'essai de détermination de l'ordre de grandeur. Il faut ajuster les concentrations des deuxième et troisième expériences de façon à mieux caractériser la courbe concentration-réponse.

34. Les dilutions du produit chimique testé sont préparées dans le solvant approprié (voir paragraphe 26 de l'annexe 2). Si la concentration maximale du produit chimique testé n'est soluble ni dans l'éthanol, ni dans le DMSO, et si l'ajout de solvant supplémentaire risque de se traduire par un dépassement de la concentration maximale de solvant acceptable dans le puits en fin d'essai, c'est la concentration immédiatement inférieure qui fait office de concentration maximale. Le cas échéant, il est possible d'ajouter une concentration supplémentaire au début de la série de concentrations, les autres concentrations demeurant inchangées.

35. On observera attentivement les puits au moment d'y verser les solutions de produit chimique testé, car cet ajout peut provoquer un précipité. Les données relatives à tous les puits qui contiennent un précipité sont exclues de l'ajustement des courbes, et la raison de cette exclusion est consignée.

36. Si d'autres sources fournissent des données sur le  $\log(\text{CI}_{50})$  d'un produit chimique testé, il peut être judicieux de répartir les dilutions géométriquement autour de cette valeur, par exemple à 0.5 unité logarithmique autour du  $\log(\text{CI}_{50})$  attendu. Le résultat final doit correspondre à une fourchette de concentrations suffisamment étendue de part et d'autre du  $\log(\text{CI}_{50})$ , comprenant le « sommet » et la « base » de la courbe de liaison afin de pouvoir la caractériser correctement.

*Organisation de la plaque d'essai*

37. Les plaques microtitre comprennent des séries de six réplicats incubés distingués par des codes correspondant au témoin avec solvant, à la concentration maximale de substance œstrogénique de référence servant aussi d'indicateur de liaison non spécifique (LNS) et au témoin avec solution tamponnée (TST), ainsi que les incubations en triple exemplaire codées de chacune des huit concentrations du témoin non ligand (octyltriéthoxysilane), des sept concentrations inférieures de la substance œstrogénique de référence, des huit concentrations du ligand faible et des huit concentrations de chaque produit chimique testé (PCT). Un exemple d'organisation de la plaque d'essai pour obtenir des courbes complètes à partir de toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins est fourni ci-dessous dans le tableau 4. D'autres plaques microtitre sont utilisées pour les produits chimiques testés, et comprennent aussi 1) une concentration élevée (remplacement maximal) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI<sub>50</sub>) d'E2 et du ligand faible, en triple exemplaire ; 2) les témoins avec solvant et des ligands non spécifiques, chacun en six réplicats (tableau 5). Un exemple d'organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive de trois produits chimiques testés inconnus est disponible dans l'appendice 3 de l'annexe 2. Les concentrations indiquées dans les tableaux 4 et 5 sont les concentrations finales de l'essai. La concentration maximale d'E2 doit s'élever à  $1 \times 10^{-7}$  M, tandis que pour le ligand faible, c'est la concentration maximale de la plaque 1 qui est utilisée. Le laboratoire détermine la CI<sub>50</sub> à partir de sa base de données historiques. Cette valeur doit être similaire à celle issue des études de validation (voir tableau 1).

**Tableau 4 : Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive, courbes concentration-réponse complètes pour la substance œstrogénique de référence et les témoins (plaque 1)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	LT (solvant seul)			LT (solvant seul)			LNS			LNS		
<b>B</b>	E2 ( $1 \times 10^{-7}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-8}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-8.5}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-9}$ )		
<b>C</b>	E2 ( $1 \times 10^{-9.5}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-10}$ )			E2 ( $1 \times 10^{-11}$ )			Blanc*		
<b>D</b>	NE ( $1 \times 10^{-4.5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-5.5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-6}$ )		
<b>E</b>	NE ( $1 \times 10^{-6.5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-7}$ )			NE ( $1 \times 10^{-7.5}$ )			NE ( $1 \times 10^{-8.5}$ )		
<b>F</b>	OTES ( $1 \times 10^{-3}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-4}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-5}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-6}$ )		
<b>G</b>	OTES ( $1 \times 10^{-7}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-8}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-9}$ )			OTES ( $1 \times 10^{-10}$ )		
<b>H</b>	Blanc (E2 chaud)**			Blanc (E2 chaud)**			Témoin avec solution tamponnée			Témoin avec solution tamponnée		

Dans cet exemple, le ligand faible est le noréthynodrel (NE)

\* Blanc réel, puits non utilisé

\*\* Blanc non utilisé pendant l'incubation, mais servant à confirmer la radioactivité totale ajoutée

**Tableau 5 : Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive, courbes concentration-réponse complètes pour les produits chimiques testés et les témoins de la plaque**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	LT (solvant seul)			LT (solvant seul)			LNS			LNS		
<b>B</b>	PCT1 ( $1 \times 10^{-3}$ )			PCT1 ( $1 \times 10^{-4}$ )			PCT1 ( $1 \times 10^{-5}$ )			PCT1 ( $1 \times 10^{-6}$ )		
<b>C</b>	PCT1 ( $1 \times 10^{-7}$ )			PCT1 ( $1 \times 10^{-8}$ )			PCT1 ( $1 \times 10^{-9}$ )			PCT1 ( $1 \times 10^{-10}$ )		
<b>D</b>	PCT2 ( $1 \times 10^{-3}$ )			PCT2 ( $1 \times 10^{-4}$ )			PCT2 ( $1 \times 10^{-5}$ )			PCT2 ( $1 \times 10^{-6}$ )		
<b>E</b>	PCT2 ( $1 \times 10^{-7}$ )			PCT2 ( $1 \times 10^{-8}$ )			PCT2 ( $1 \times 10^{-9}$ )			PCT2 ( $1 \times 10^{-10}$ )		
<b>F</b>	PCT3 ( $1 \times 10^{-3}$ )			PCT3 ( $1 \times 10^{-4}$ )			PCT3 ( $1 \times 10^{-5}$ )			PCT3 ( $1 \times 10^{-6}$ )		
<b>G</b>	PCT3 ( $1 \times 10^{-7}$ )			PCT3 ( $1 \times 10^{-8}$ )			PCT3 ( $1 \times 10^{-9}$ )			PCT3 ( $1 \times 10^{-10}$ )		
<b>H</b>	NE (CI <sub>50</sub> )			NE ( $1 \times 10^{-4.5}$ )			E2 (CI <sub>50</sub> )			E2 ( $1 \times 10^{-7}$ )		

Dans cet exemple, le ligand faible est le noréthynodrel (NE)

#### Mise en œuvre de l'essai de liaison compétitive

38. Comme le montre le tableau 6, on ajoute dans les puits 80 µL de témoin avec solvant, de témoin avec solution tamponnée, de substance œstrogénique de référence, de ligand faible, de non-ligand et de produit chimique testé. Chaque puits reçoit ensuite 40 µL d'une solution de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol à 4 nM. Après 10 à 15 minutes de rotation douce à une température située entre 2 et 8 °C, 40 µL d'une solution de hrERα sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques d'essai microtitre sont placées sur un rotateur et incubées entre 2 et 8 °C pendant 16 à 20 heures.

**Tableau 6 : Volume des éléments de l'essai de liaison compétitive au hrER, plaques microtitre**

<i>Volume (µL)</i>	<i>Constituant</i>
80	17β-œstradiol non marqué, noréthynodrel, OTES, produits chimiques testés, solvant ou solution tamponnée
40	Solution de [ <sup>3</sup> H]-17β-œstradiol à 4 nM
40	Solution de hrERα de concentration déterminée par l'essai préliminaire
<b>160</b>	<b><i>Volume total dans chaque puits d'essai</i></b>

39. Le [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol lié au hrERα est séparé du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol libre en ajoutant 80 µL d'une suspension froide de DCC dans chaque puits, puis quantifié en suivant la méthode décrite dans les paragraphes 20-23 concernant l'essai de liaison à saturation.

40. Les puits H1 à H6 (« blanc (E2 chaud) » dans le tableau 4) fournissent les désintégrations par minute du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol dans 40 μL. Les aliquotes de 40 μL sont versées directement dans le scintillateur liquide contenu dans les puits H1 – H6.

### Critères d'acceptabilité

#### *Essai de liaison à saturation*

41. La courbe de liaison spécifique doit atteindre un plateau pour les concentrations les plus élevées de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol, le cas échéant, ce qui traduit la saturation des hrERα avec le ligand.

42. Il faut que la liaison spécifique induite par le [3H]-17β-œstradiol à 1 nM corresponde à une radioactivité égale à 15 à 25 % de la moyenne de la radioactivité totale mesurée dans tous les essais. On peut occasionnellement admettre quelques valeurs en dehors de cette fourchette, mais si les résultats de l'essai la dépassent régulièrement ou si un essai donne des résultats très éloignés de cette fourchette, il convient d'ajuster la concentration de protéine et de répéter l'essai de liaison à saturation.

43. Les données doivent aboutir à une représentation de Scatchard linéaire.

44. La liaison non spécifique ne doit pas être excessive : elle est généralement inférieure à 35 % de la liaison totale. Le ratio de ces liaisons pourra néanmoins parfois dépasser ce chiffre s'agissant de mesurer des désintégrations par minutes très faibles pour la concentration d'essai de 17β-œstradiol radiomarcé la plus basse.

#### *Essai de liaison compétitive*

45. Des concentrations croissantes de 17β-œstradiol non marqué doivent déplacer le [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol des récepteurs selon un modèle de liaison compétitive sur un seul site.

46. Il faut que la CI<sub>50</sub> de la substance œstrogénique de référence (17β-œstradiol) soit *grosso modo* égale à la concentration molaire de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol plus la K<sub>d</sub> établie par l'essai de liaison à saturation.

47. La liaison spécifique totale doit rester cohérente et s'élever à 20 ± 5 % lorsque la concentration moyenne de la radioactivité totale ajoutée à chaque puits vaut 1 nM pour tous les essais. On peut occasionnellement admettre quelques valeurs en dehors de cette fourchette, mais si les résultats de l'essai la dépassent régulièrement ou si un essai donne des résultats très éloignés de cette fourchette, il convient d'ajuster la concentration de protéine et de répéter l'essai de liaison à saturation.

48. Le solvant ne doit pas modifier la sensibilité ou la reproductibilité de l'essai. Les résultats du témoin avec solvant (puits TS) sont comparés à ceux obtenus pour le témoin avec solution tamponnée (TST) afin de vérifier que le solvant utilisé ne perturbe pas le système d'essai. Quand le solvant n'a aucun effet sur l'essai, les résultats correspondant au TS et au TST sont comparables.

49. Le non-ligand ne doit pas remplacer plus de 25 % du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol lié au hrERα à des concentrations allant jusqu'à 10<sup>-3</sup> M (OTES) ou 10<sup>-4</sup> M (DBP).

50. Des critères de performance ont été définis pour la substance œstrogénique de référence et pour les deux ligands faibles (p.ex. noréthynodrel et noréthindrone) à partir des données de l'étude de validation de l'essai de liaison au hrER de FW (annexe N de la référence 2). Les intervalles de confiance à 95 % découlent des

valeurs moyenne (n) +/- ET calculées grâce à l'ensemble des essais témoins effectués par les laboratoires participant à l'étude de validation. Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés pour les paramètres d'ajustement des courbes (p.ex. sommet, base, pente de Hill et  $\log CI_{50}$ ) correspondant à la substance œstrogénique de référence et aux ligands faibles ainsi que pour le  $\log_{10} ALR$  des ligands faibles par rapport à la substance œstrogénique de référence. Ces intervalles sont fournis à titre de critères de performance des témoins positifs. Le tableau 1 présente les fourchettes attendues pour les paramètres d'ajustement des courbes pouvant faire office de critères de performance. En pratique, la fourchette de la  $CI_{50}$  peut varier légèrement en fonction de la  $K_d$  de la préparation de récepteurs et de la concentration du ligand.

51. Aucun critère de performance n'a été établi pour les paramètres d'ajustement des courbes correspondant aux produits chimiques testés du fait de la grande diversité des composés potentiellement testés ainsi que des affinités et résultats correspondants (p.ex. ajustement complet, partiel ou nul des courbes). On fera toutefois appel à un avis professionnel pour analyser les résultats de chaque essai sur un produit chimique. Il convient d'avoir recours à une fourchette de concentrations d'essai suffisante pour définir clairement le sommet de la courbe de liaison compétitive (p.ex. pour induire 90 à 100 % de liaison). La variabilité entre les réplicats de chaque concentration du produit chimique testé et entre les trois essais non simultanés doit rester raisonnable et défendable sur le plan scientifique. Il est nécessaire que les témoins utilisés pour chaque essai sur un produit chimique testé soient proches des mesures de la performance documentées pour cette méthode de FW, et en harmonie avec les données historiques obtenues pour les témoins par chaque laboratoire.

## ANALYSE DES DONNÉES

### Essai de liaison à saturation

52. Cet essai mesure la liaison totale et la liaison non spécifique. Ces valeurs permettent de calculer la liaison spécifique induite par des concentrations croissantes de  $[^3H]$ -17 $\beta$ -œstradiol à l'équilibre, en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale. La courbe reportant la liaison spécifique en fonction de la concentration de  $[^3H]$ -17 $\beta$ -œstradiol doit atteindre un plateau pour la liaison spécifique maximale, qui indique la saturation des hrER $\alpha$  par le  $[^3H]$ -17 $\beta$ -œstradiol. De plus, l'analyse des données documente la liaison du  $[^3H]$ -17 $\beta$ -œstradiol à un site de liaison unique à haute affinité. Il faut que la courbe de liaison à saturation indique les liaisons non spécifique, totale et spécifique. Une régression non linéaire (p.ex. BioSoft ; McPherson, 1985 ; Motulsky, 1995) permet d'approfondir l'analyse des données, et les résultats sont finalement présentés sous forme d'une représentation de Scatchard.

53. L'analyse des données doit déterminer la  $B_{max}$  et la  $K_d$  en se fondant uniquement sur les données de liaison totale, étant supposé que la liaison non spécifique est linéaire, à moins de justifier le recours à une autre méthode. Par ailleurs, on détermine le meilleur ajustement des courbes à l'aide d'une analyse de régression solide, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. La méthode choisie pour cette analyse de régression solide sera indiquée. Une correction relative à la perte de ligand (p.ex. avec la méthode de Swillens, 1995) sera toujours appliquée pour déterminer la  $B_{max}$  et la  $K_d$  à partir des données de liaison à saturation.

### Essai de liaison compétitive

54. La courbe de liaison compétitive présente la liaison spécifique du  $[^3H]$ -17 $\beta$ -œstradiol en fonction de la

concentration (en  $\log_{10}$ ) du compétiteur. La concentration de produit chimique testé qui inhibe 50 % de la liaison spécifique maximale du [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol correspond à la  $\text{CI}_{50}$ .

55. Des estimations des  $\log(\text{CI}_{50})$  des témoins positifs (p.ex. substance œstrogénique de référence et ligand faible) sont obtenues grâce à un logiciel approprié d'ajustement de courbe par méthode non linéaire d'après une équation de Hill à quatre paramètres (p.ex. BioSoft ; McPherson, 1985 ; Motulsky, 1995). Ces ajustements se font sans imposer de limites au sommet, à la base, à la pente et au  $\log(\text{CI}_{50})$  des courbes. Le meilleur ajustement des courbes est établi grâce à une analyse de régression solide, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. Aucune correction n'est effectuée pour la perte de ligand. Après l'analyse initiale, chaque courbe de liaison est examinée pour vérifier qu'elle est bien ajustée au modèle. L'affinité de liaison relative (ALR) du ligand faible est exprimée en pourcentage à partir du rapport entre le  $\log(\text{CI}_{50})$  du ligand faible et le  $\log(\text{CI}_{50})$  du 17 $\beta$ -œstradiol. Les résultats des témoins positifs et du témoin non ligand sont évalués à partir des mesures de la performance de l'essai indiquées dans les paragraphes 45-50 de l'annexe 2.

56. Les données obtenues pour tous les produits chimiques testés doivent être analysées par étape pour veiller à l'évaluation appropriée des résultats et à la classification correcte de chaque courbe de liaison compétitive. Ainsi, pour chaque essai sur un produit chimique, il est d'abord recommandé d'effectuer une analyse des données normalisée identique à celle utilisée pour la substance œstrogénique de référence et les témoins avec ligand de faible affinité (voir paragraphe 55 précédent). Cette étape est suivie d'un examen technique de l'ajustement des paramètres de la courbe et d'un examen visuel pour déterminer dans quelle mesure les données correspondent à la courbe de liaison compétitive obtenue pour chaque essai. Cet examen technique repose sur trois observations indiquant que l'essai et les analyses ont été réalisés correctement : une baisse du pourcentage de [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol lié aux sites spécifiques en fonction de la concentration, une faible variabilité entre les réplicats techniques de chaque concentration de produit chimique testé et la cohérence des paramètres d'ajustement entre les trois essais.

### Interprétation des données

57. Sous réserve du respect de l'ensemble des critères d'acceptabilité, un produit chimique testé est considéré comme ligand du hrER $\alpha$  si sa courbe de liaison peut être ajustée et si le point le plus bas de la courbe de réponse obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison inférieure à 50 % (graphique 1).

58. Sous réserve du respect de l'ensemble des critères d'acceptabilité, un produit chimique testé est considéré comme non-ligand du hrER $\alpha$  si :

- sa courbe de liaison peut être ajustée et si le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison supérieure à 75 %, ou
- sa courbe de liaison ne peut pas être ajustée et si la moyenne des pourcentages de liaison non lissés de tous les groupes de concentration de l'essai est supérieure à 75 %.

59. Les produits chimiques testés sont considérés comme équivoques si aucune des conditions qui précèdent n'est satisfaite (p.ex. le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée correspond à une liaison située entre 76 et 51 %).

Tableau 7. Critère de classification d'un produit chimique testé fondée sur sa courbe de liaison compétitive

Classification	Critères
Ligand <sup>a</sup>	<p>Il est possible d'ajuster la courbe.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Le point le plus bas de la courbe de réponse obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison inférieure à 50 %.</b></li> </ul>
Non-ligand <sup>b</sup>	<p>S'il est possible d'ajuster la courbe,</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison supérieure à 75 %.</b></li> </ul> <p>S'il n'est pas possible d'ajuster la courbe,</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>la moyenne des pourcentages de liaison non lissés de tous les groupes de concentration de l'essai est supérieure à 75 %.</b></li> </ul>
Équivoque <sup>c</sup>	<p>Essai évaluable qui ne peut être classé ni comme ligand, ni comme non-ligand.</p> <p>(P.ex. le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée correspond à une liaison située entre 76 et 51 %.)</p>

**Graphique 1. Exemples de classification d'un produit chimique testé grâce à la courbe de liaison compétitive**

$\% \text{ Radioligand bound} = \% \text{ de ligand radiomarqué lié} / \text{Concentration (log Molar)} = \text{Concentration (logM)}$

60. Les différents essais réalisés par un laboratoire sur un produit chimique testé sont combinés en attribuant des valeurs numériques à chaque essai et en calculant la moyenne de ces valeurs, comme l'indique le tableau 8. Les résultats combinés des essais de chaque laboratoire sont alors comparés à la classification attendue pour chaque produit chimique testé.

**Tableau 8. Méthode de classification d'un produit chimique testé à partir de plusieurs essais dans un même laboratoire**

Attribution d'une valeur à chaque essai :	
Classification	Valeur numérique
Ligand	2
Équivoque	1
Non-ligand	0
Classification selon la moyenne des valeurs numériques de toutes les expériences :	
Classification	Valeur numérique
Ligand	Moyenne $\geq 1.5$
Équivoque	$0.5 \leq \text{moyenne} < 1.5$
Non-ligand	Moyenne $< 0.5$

#### RAPPORT D'ESSAI

61. Voir le paragraphe 24 de la partie « **ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE LIAISON AU hrER** » de la présente Ligne directrice pour les essais.

**Appendice 1 : Liste de termes**

**DCC** : *dextran-coated charcoal* (charbon enrobé de dextrane).

**E2** : 17 $\beta$ -œstradiol non marqué (inerte).

**Essai** : série complète d'expériences simultanées dans les puits d'une plaque microtitre livrant l'ensemble des données nécessaires pour caractériser l'affinité de liaison au hrER $\alpha$  d'un produit chimique testé, soit la quantité totale de [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol ajoutée dans un puits, la liaison maximale au hrER $\alpha$  du [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol, la liaison non spécifique et la liaison totale pour diverses concentrations du produit chimique testé. Un essai peut reposer sur un seul puits d'essai (réplicat) par concentration, mais dans la mesure où le présent protocole exige des expériences en triple exemplaire, un essai requiert ici trois puits d'essai par concentration. De plus, le présent protocole impose de réaliser trois essais indépendants (non simultanés) par produit chimique.

**[<sup>3</sup>H] E2** : 17 $\beta$ -œstradiol radiomarqué au tritium.

**hrER $\alpha$**  : récepteur des œstrogènes alpha recombinant humain (domaine de liaison du ligand).

**Réplicat** : un des multiples puits qui contiennent les mêmes éléments aux mêmes concentrations et sont testés simultanément dans un même essai. Le présent protocole prévoit que chaque concentration du produit chimique testé soit soumise à l'essai en triple exemplaire, c'est-à-dire que trois réplicats de chacune d'elle sont testés simultanément.

**Solution d'essai tamponnée** : solution composée de 10 mM de tris, 10 mg/mL d'albumine sérique bovine, 2 mM de DTT, 10 % de glycérol et 0.2 mM de leupeptine, à pH 7.5.

## Appendice 2 :

Essai classique de saturation par le [3H]-17 $\beta$ -œstradiol en triple exemplaire

Essai classique de saturation par le [ <sup>3</sup> H]-17 $\beta$ -œstradiol en triple exemplaire											
Position	Réplicat	Code par type de puits	Concentration initiale d'E2 chaud (nM)	Volume d'E2 chaud ( $\mu$ L)	Concentration finale d'E2 chaud (nM)	Concentration initiale d'E2 froid ( $\mu$ M)	Volume d'E2 froid ( $\mu$ L)	Concentration finale d'E2 froid ( $\mu$ M)	Volume de solution tamponnée ( $\mu$ L)	Volume de récepteur ( $\mu$ L)	Volume total dans les puits
A1	1	H	0.12	40	0.03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0.12	40	0.03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0.12	40	0.03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0.24	40	0.06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0.24	40	0.06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0.24	40	0.06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0.32	40	0.08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0.32	40	0.08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0.32	40	0.08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0.40	40	0.10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0.40	40	0.10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0.40	40	0.10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1.20	40	0.30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1.20	40	0.30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1.20	40	0.30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2.40	40	0.60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2.40	40	0.60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2.40	40	0.60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4.00	40	1.00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4.00	40	1.00	—	—	—	80	40	160
B9	3	H	4.00	40	1.00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12.00	40	3.00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12.00	40	3.00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12.00	40	3.00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0.12	40	0.03	0.06	80	0.03	—	40	160
D2	2	HC	0.12	40	0.03	0.06	80	0.03	—	40	160
D3	3	HC	0.12	40	0.03	0.06	80	0.03	—	40	160
D4	1	HC	0.24	40	0.06	0.12	80	0.06	—	40	160
D5	2	HC	0.24	40	0.06	0.12	80	0.06	—	40	160
D6	3	HC	0.24	40	0.06	0.12	80	0.06	—	40	160
D7	1	HC	0.32	40	0.08	0.16	80	0.08	—	40	160
D8	2	HC	0.32	40	0.08	0.16	80	0.08	—	40	160
D9	3	HC	0.32	40	0.08	0.16	80	0.08	—	40	160
D10	1	HC	0.40	40	0.10	0.2	80	0.1	—	40	160
D11	2	HC	0.40	40	0.10	0.2	80	0.1	—	40	160
D12	3	HC	0.40	40	0.10	0.2	80	0.1	—	40	160

Essai classique de saturation par le [ <sup>3</sup> H]-17β-œstradiol en trois exemplaires											
Position	Réplicat	Code par type de puits	Concentration initiale d'E2 chaud (nM)	Volume d'E2 chaud (μL)	Concentration finale d'E2 chaud (nM)	Concentration initiale d'E2 froid (μM)	Volume d'E2 froid (μL)	Concentration finale d'E2 froid (μM)	Volume de solution tamponnée (μL)	Volume de récepteur (μL)	Volume total dans les puits
E1	1	HC	1.20	40	0.30	0.6	80	0.3	—	40	160
E2	2	HC	1.20	40	0.30	0.6	80	0.3	—	40	160
E3	3	HC	1.20	40	0.30	0.6	80	0.3	—	40	160
E4	1	HC	2.40	40	0.60	1.2	80	0.6	—	40	160
E5	2	HC	2.40	40	0.60	1.2	80	0.6	—	40	160
E6	3	HC	2.40	40	0.60	1.2	80	0.6	—	40	160
E7	1	HC	4.00	40	1.00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4.00	40	1.00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4.00	40	1.00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12.00	40	3.00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12.00	40	3.00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12.00	40	3.00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Chaud	0.12	40	0.03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Chaud	0.12	40	0.03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Chaud	0.12	40	0.03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Chaud	0.24	40	0.06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Chaud	0.24	40	0.06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Chaud	0.24	40	0.06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Chaud	0.32	40	0.08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Chaud	0.32	40	0.08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Chaud	0.32	40	0.08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Chaud	0.40	40	0.10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Chaud	0.40	40	0.10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Chaud	0.40	40	0.10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Chaud	1.20	40	0.30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Chaud	1.20	40	0.30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Chaud	1.20	40	0.30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Chaud	2.40	40	0.60	—	—	—	—	—	40
H5	2	Chaud	2.40	40	0.60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Chaud	2.40	40	0.60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Chaud	4.00	40	1.00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Chaud	4.00	40	1.00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Chaud	4.00	40	1.00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Chaud	12.00	40	3.00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Chaud	12.00	40	3.00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Chaud	12.00	40	3.00	—	—	—	—	—	40

Veillez noter que les puits codés « chaud » sont vides pendant l'incubation. Les 40 μL qui y sont ensuite ajoutés ne servent qu'au comptage par scintillation.

## Appendice 3 : Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Répliquat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de solution mère de hrER (µL)	Volume de solution	Volume de traceur (E2 chaud) (µL)	Volume issu de la plaque de dilution (µL)	Volume final (µL)	Concentration finale du compétiteur (M)
S	A1	1	liaison totale	LT	LT1	-	40	-	40	80	160	-
S	A2	2	liaison totale	LT	LT2	-	40	-	40	80	160	-
S	A3	3	liaison totale	LT	LT3	-	40	-	40	80	160	-
S	A4	1	liaison totale	LT	LT4	-	40	-	40	80	160	-
S	A5	2	liaison totale	LT	LT5	-	40	-	40	80	160	-
S	A6	3	liaison totale	LT	LT6	-	40	-	40	80	160	-
S	A7	1	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A8	2	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A9	3	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A10	1	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A11	2	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	A12	3	E2 froid (élevé)	LNS	S0	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	B1	1	E2 froid	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B2	2	E2 froid	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B3	3	E2 froid	S	S1	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	B4	1	E2 froid	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B5	2	E2 froid	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B6	3	E2 froid	S	S2	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	B7	1	E2 froid	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B8	2	E2 froid	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B9	3	E2 froid	S	S3	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	B10	1	E2 froid	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	B11	2	E2 froid	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	B12	3	E2 froid	S	S4	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	C1	1	E2 froid	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C2	2	E2 froid	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C3	3	E2 froid	S	S5	6.00E-10	40	-	40	80	160	3.0E-10
S	C4	1	E2 froid	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C5	2	E2 froid	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C6	3	E2 froid	S	S6	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	C7	1	E2 froid	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C8	2	E2 froid	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C9	3	E2 froid	S	S7	2.00E-11	40	-	40	80	160	1.0E-11
S	C10	1	blanc	blanc	B1	-	-	160	-	-	160	-
S	C11	2	blanc	blanc	B2	-	-	160	-	-	160	-
S	C12	3	blanc	blanc	B3	-	-	160	-	-	160	-
S	D1	1	noréthynodrel	NE	LF1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D2	1	noréthynodrel	NE	LF1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D3	1	noréthynodrel	NE	LF1	6.00E-05	40	-	40	80	160	3.0E-05
S	D4	1	noréthynodrel	NE	LF2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D5	1	noréthynodrel	NE	LF2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D6	1	noréthynodrel	NE	LF2	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	D7	1	noréthynodrel	NE	LF3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D8	1	noréthynodrel	NE	LF3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D9	1	noréthynodrel	NE	LF3	6.00E-06	40	-	40	80	160	3.0E-06
S	D10	1	noréthynodrel	NE	LF4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	D11	1	noréthynodrel	NE	LF4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	D12	1	noréthynodrel	NE	LF4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06

## Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de solution mère de hrER (µL)	Volume de solution tamponnée (µL)	Volume de traceur (E2 chaud) (µL)	Volume issu de la plaque de dilution (µL)	Volume final (µL)	Concentration finale du compétiteur (M)
S	E1	1	noréthynodrel	NE	LF5	6.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	E2	2	noréthynodrel	NE	LF5	6.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	E3	3	noréthynodrel	NE	LF5	6.00E-07	40	-	40	80	160	3.0E-07
S	E4	1	noréthynodrel	NE	LF6	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	E5	2	noréthynodrel	NE	LF6	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	E6	3	noréthynodrel	NE	LF6	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	E7	1	noréthynodrel	NE	LF7	6.00E-08	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E8	2	noréthynodrel	NE	LF7	6.00E-08	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E9	3	noréthynodrel	NE	LF7	6.00E-08	40	-	40	80	160	3.0E-08
S	E10	1	noréthynodrel	NE	LF8	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E11	2	noréthynodrel	NE	LF8	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	E12	3	noréthynodrel	NE	LF8	6.00E-09	40	-	40	80	160	3.0E-09
S	F1	1	OTES	N	OTES1	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F2	2	OTES	N	OTES1	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F3	3	OTES	N	OTES1	2.00E-03	40	-	40	80	160	1.0E-03
S	F4	1	OTES	N	OTES2	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F5	2	OTES	N	OTES2	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F6	3	OTES	N	OTES2	2.00E-04	40	-	40	80	160	1.0E-04
S	F7	1	OTES	N	OTES3	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES3	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES3	2.00E-05	40	-	40	80	160	1.0E-05
S	F10	1	OTES	N	OTES4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F11	2	OTES	N	OTES4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	F12	3	OTES	N	OTES4	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
S	G1	1	OTES	N	OTES5	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	G2	2	OTES	N	OTES5	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	G3	3	OTES	N	OTES5	2.00E-07	40	-	40	80	160	1.0E-07
S	G4	1	OTES	N	OTES6	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G5	2	OTES	N	OTES6	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G6	3	OTES	N	OTES6	2.00E-08	40	-	40	80	160	1.0E-08
S	G7	1	OTES	N	OTES7	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G8	2	OTES	N	OTES7	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G9	3	OTES	N	OTES7	2.00E-09	40	-	40	80	160	1.0E-09
S	G10	1	OTES	N	OTES8	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	G11	2	OTES	N	OTES8	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	G12	3	OTES	N	OTES8	2.00E-10	40	-	40	80	160	1.0E-10
S	H1	1	chaud	C	C1	-	-	-	40	-	40	-
S	H2	2	chaud	C	C2	-	-	-	40	-	40	-
S	H3	3	chaud	C	C3	-	-	-	40	-	40	-
S	H4	1	chaud	C	C4	-	-	-	40	-	40	-
S	H5	2	chaud	C	C5	-	-	-	40	-	40	-
S	H6	3	chaud	C	C6	-	-	-	40	-	40	-
S	H7	1	tampon	TST	TST1	-	40	80	40	-	160	-
S	H8	2	tampon	TST	TST2	-	40	80	40	-	160	-
S	H9	3	tampon	TST	TST3	-	40	80	40	-	160	-
S	H10	1	tampon	TST	TST4	-	40	80	40	-	160	-
S	H11	2	tampon	TST	TST5	-	40	80	40	-	160	-
S	H12	3	tampon	TST	TST6	-	40	80	40	-	160	-

Veillez noter que les puits codés « chaud » sont vides pendant l'incubation. Les 40 µL qui y sont ensuite ajoutés ne servent qu'au comptage par scintillation.

## Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de solution mère de hrER (µL)	Volume de solution tamponnée (µL)	Volume de traceur (E2 chaud) (µL)	Volume issu de la plaque de dilution (µL)	Volume final (µL)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	A1	1	liaison totale	LT	T	-	40	-	40	80	160	-
P1	A2	2	liaison totale	LT	L	-	40	-	40	80	160	-
P1	A3	3	liaison totale	LT	L	-	40	-	40	80	160	-
P1	A4	1	liaison totale	LT	L	-	40	-	40	80	160	-
P1	A5	2	liaison totale	LT	L	-	40	-	40	80	160	-
P1	A6	3	liaison totale	LT	L	-	40	-	40	80	160	-
P1	A7	1	E2 froid (élevé)	LNS	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A8	2	E2 froid (élevé)	LNS	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A9	3	E2 froid (élevé)	LNS	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A10	1	E2 froid (élevé)	LNS	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A11	2	E2 froid (élevé)	LNS	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	A12	3	E2 froid (élevé)	LNS	S	2.00E-06	40	-	40	80	160	1.0E-06
P1	B1	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B2	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B3	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	B4	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B5	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B6	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	B7	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B8	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B9	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	B10	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B11	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	B12	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	C1	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C2	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C3	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	C4	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C5	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C6	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	C7	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C8	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C9	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	C10	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C11	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	C12	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	D1	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D2	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D3	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	D4	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D5	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D6	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	D7	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D8	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D9	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	D10	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D11	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	D12	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	E1	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E2	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	E3	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07

## Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de solution mère de hrER (µL)	Volume de solution tamponnée (µL)	Volume de traceur (E2 chaud) (µL)	Volume issu de la plaque de dilution (µL)	Volume final (µL)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	E4	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E5	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E6	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	E7	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E8	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E9	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	E10	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E11	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	E12	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	F1	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F2	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F3	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	1	2.00E-03	40	0	40	80	160	1.0E-03
P1	F4	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F5	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F6	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	2	2.00E-04	40	0	40	80	160	1.0E-04
P1	F7	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F8	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F9	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	3	2.00E-05	40	0	40	80	160	1.0E-05
P1	F10	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F11	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	F12	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	4	2.00E-06	40	0	40	80	160	1.0E-06
P1	G1	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G2	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G3	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	5	2.00E-07	40	0	40	80	160	1.0E-07
P1	G4	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G5	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G6	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	6	2.00E-08	40	0	40	80	160	1.0E-08
P1	G7	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G8	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G9	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	7	2.00E-09	40	0	40	80	160	1.0E-09
P1	G10	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G11	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	G12	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	8	2.00E-10	40	0	40	80	160	1.0E-10
P1	H1	1	noréthynodrel	NE	CI50		40	0	40	80	160	
P1	H2	2	noréthynodrel	NE	CI50		40	0	40	80	160	
P1	H3	3	noréthynodrel	NE	CI50		40	0	40	80	160	
P1	H4	1	noréthynodrel	NE	1.00E-4.5		40	0	40	80	160	
P1	H5	2	noréthynodrel	NE	1.00E-4.5		40	0	40	80	160	
P1	H6	3	noréthynodrel	NE	1.00E-4.5		40	0	40	80	160	
P1	H7	1	E2 froid	S	CI50		40	0	40	80	160	
P1	H8	2	E2 froid	S	CI50		40	0	40	80	160	
P1	H9	3	E2 froid	S	CI50		40	0	40	80	160	
P1	H10	1	E2 froid	S	1.00E-7		40	0	40	80	160	
P1	H11	2	E2 froid	S	1.00E-7		40	0	40	80	160	
P1	H12	3	E2 froid	S	1.00E-7		40	0	40	80	160	

**ANNEXE 3****Protocole de l'essai *in vitro* de liaison au récepteur des œstrogènes (ER) fondé sur la protéine du domaine de liaison du ligand de l'ER $\alpha$  recombinant humain conformément à la méthode du CERI**

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

1. Cette méthode d'essai *in vitro* de liaison à saturation et de liaison compétitive au récepteur des œstrogènes (ER $\alpha$ ) fait appel au domaine de liaison du ligand (DLL) du récepteur des œstrogènes  $\alpha$  humain (hrER $\alpha$ ). Cette protéine chimère a été produite par le Chemicals Evaluation Research Institute (CERI, Japon), et existe sous forme de protéine de fusion glutathion-S-transférase (GST), exprimée par *E. coli*. Le protocole mis au point par le CERI a fait l'objet d'une étude de validation internationale réalisée par plusieurs laboratoires (2). Cette étude a démontré la pertinence et la fiabilité de cette méthode aux fins prévues.

2. La présente méthode d'essai constitue une procédure de dépistage visant à détecter les substances qui peuvent se lier au hrER $\alpha$ . Elle permet de déterminer la capacité d'un produit chimique testé à former les liaisons avec le DLL du hrER $\alpha$  en concurrence avec le 17 $\beta$ -œstradiol. Sur le plan quantitatif, l'essai peut livrer les résultats suivants : la CI<sub>50</sub>, soit la concentration de produit chimique testé nécessaire pour remplacer la moitié du [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol lié au hrER $\alpha$ , et les affinités de liaison relatives (ALR) vis-à-vis du hrER $\alpha$  des produits chimiques testés par rapport au 17 $\beta$ -œstradiol. L'essai visant à dépister les produits chimiques, les résultats acceptables sur le plan qualitatif sont la classification des produits chimiques testés soit comme ligand ou non-ligand du hrER $\alpha$ , soit comme équivoque, en fonction de critères définis à partir des courbes de liaison.

3. Étant donné que l'essai fait appel à un ligand radiomarqué, le laboratoire doit disposer d'une autorisation de manipuler des matériaux radioactifs. Toutes les procédures qui impliquent des isotopes radioactifs ou des produits chimiques dangereux doivent être conformes aux réglementations et aux procédures établies par la législation nationale.

4. Il convient de lire les parties « **INTRODUCTION GÉNÉRALE** » et « **ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE LIAISON AU hrER** » (pages 1 à 14) avant de mettre en œuvre la présente méthode d'essai à des fins réglementaires. Les définitions et abréviations utilisées dans cette Ligne directrice sont indiquées à l'annexe 1.

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

5. L'essai de liaison au hrER $\alpha$  repose principalement sur la mesure de la capacité d'un ligand radiomarqué ([<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol) à se lier aux ER en présence de concentrations croissantes de produit chimique testé (appelé « compétiteur »). Les produits chimiques testés qui présentent une forte affinité de liaison avec les ER entrent en concurrence avec le ligand radiomarqué à une concentration plus faible que les composés ayant une affinité moindre vis-à-vis du récepteur.

6. L'essai comporte deux grands éléments : une expérience de liaison à saturation pour établir les paramètres de l'interaction récepteur-ligand, puis une expérience de liaison compétitive visant à déterminer dans quelle mesure un produit chimique testé fait concurrence à un ligand radiomarqué pour se fixer aux ER.

7. L'objectif de l'expérience de liaison à saturation est de caractériser le nombre et l'affinité de liaison des récepteurs dans un lot donné, dans la perspective de l'essai de liaison compétitive. L'expérience de liaison à saturation permet de mesurer, à l'équilibre, l'affinité d'une concentration fixe de récepteurs des œstrogènes vis-à-vis de leur ligand naturel (représentée par la constante de dissociation  $K_d$ ), ainsi que la concentration de sites récepteurs actifs ( $B_{max}$ ).

8. L'expérience de liaison compétitive détermine l'affinité d'une substance à se lier aux ER en concurrence avec le [ $^3$ H]-17 $\beta$ -œstradiol. Cette affinité est quantifiée par la concentration de produit chimique testé qui, à l'équilibre, inhibe 50 % des liaisons spécifiques du [ $^3$ H]-17 $\beta$ -œstradiol, appelée « concentration induisant 50 % d'inhibition » ou  $CI_{50}$ ). Elle peut aussi s'exprimer par l'affinité de liaison relative (ALR, calculée par rapport à la  $CI_{50}$  de l'œstradiol mesurée séparément lors du même essai). L'expérience de liaison compétitive mesure la liaison aux ER du [ $^3$ H]-17 $\beta$ -œstradiol en concentration fixe en présence d'une large fourchette (huit ordres de grandeur) de concentrations du produit chimique testé. Les données sont ensuite ajustées, quand c'est possible, à une forme de l'équation de Hill (Hill, 1910) décrivant le remplacement du ligand radiomarqué par un compétiteur sur un site unique. L'ampleur du remplacement du ligand radiomarqué œstradiol à l'équilibre permet alors de caractériser le produit chimique testé comme ligand, non-ligand ou équivoque.

## MODE OPÉRATOIRE

### Démonstration de l'acceptabilité de la performance de la protéine hrER $\alpha$

9. Avant d'effectuer de manière routinière les essais de liaison à saturation et de liaison compétitive, il faut vérifier que chaque nouveau lot de hrER $\alpha$  fonctionne correctement dans le laboratoire où il doit être utilisé. Cette démonstration de la performance repose sur un processus en deux étapes :

- Essai de liaison à saturation avec du [ $^3$ H]-17 $\beta$ -œstradiol pour démontrer la saturation et la spécificité vis-à-vis du hrER $\alpha$ . Une analyse de régression non linéaire des données obtenues (p.ex. BioSoft ; McPherson, 1985 ; Motulsky, 1995) permettant d'obtenir une représentation de Scatchard, livrera l'affinité de liaison au hrER $\alpha$  du [ $^3$ H]-17 $\beta$ -œstradiol ( $K_d$ ) ainsi que le nombre de récepteurs ( $B_{max}$ ), pour un lot de hrER $\alpha$  donné.
- Essai de liaison compétitive avec les témoins (substance œstrogénique de référence [17 $\beta$ -œstradiol], ligand faible [noréthynodrel ou noréthindrone] et non-ligand [octyltriéthoxysilane, OTES]). Chaque laboratoire est tenu de créer une base de données historiques visant à documenter que la  $CI_{50}$  et les valeurs pertinentes relatives à la substance œstrogénique de référence et au ligand faible restent cohérentes d'une expérience à l'autre et d'un lot de hrER $\alpha$  à l'autre. Il faut que les paramètres des courbes de liaison compétitive obtenus pour les substances témoins demeurent dans les limites de l'intervalle de confiance à 95 % (voir tableau 1) déterminées grâce aux données des laboratoires participant à l'étude de validation de l'essai (2).

**Tableau 1. Critères de performance établis pour la substance œstrogénique de référence et le ligand faible dans l'essai de liaison au hrER du CERI**

Substance	Paramètre	Moyenne <sup>a</sup>	Écart-type (n)	Intervalle de confiance à 95 % <sup>b</sup>	
				Limite minimale	Limite maximale
17β-œstradiol	Sommet	104.74	13.12 (70)	101.6	107.9
	Base	0.85	2.41 (70)	0.28	1.43
	Pente de Hill	-1.22	0.20 (70)	-1.27	-1.17
	LogCI <sub>50</sub>	-8.93	0.23 (70)	-8.98	-8.87
Noréthynodrel	Sommet	101.31	10.55 (68)	98.76	103.90
	Base	2.39	5.01 (68)	1.18	3.60
	Pente de Hill	-1.04	0.21 (68)	-1.09	-0.99
	LogCI <sub>50</sub>	-6.19	0.40 (68)	-6.29	-6.10
Noréthindrone <sup>c</sup>	Sommet	92.27	7.79 (23)	88.90	95.63
	Base	16.52	10.59 (23)	11.94	21.10
	Pente de Hill	-1.18	0,32 (23)	-1.31	-1.04
	LogCI <sub>50</sub>	-6.01	0.54 (23)	-6.25	-5.78

<sup>a</sup> Les valeurs moyenne ± écart-type (ET) pour l'échantillon de taille (n) ont été calculées à partir d'estimations des paramètres d'ajustement des courbes (équation de Hill à quatre paramètres) issus des essais sur les témoins réalisés par quatre laboratoires dans le cadre de l'étude de validation (voir annexe N de la référence 2).

<sup>b</sup> Les intervalles de confiance à 95 % sont fournis à titre d'orientation pour les critères d'acceptabilité.

<sup>c</sup> L'essai avec la noréthindrone était optionnel pour le volet IV de l'étude de validation (voir référence 2, Subtask IV). Ainsi, les valeurs moyenne ± ET (n) ont été calculées grâce aux estimations des paramètres d'ajustement des courbes (équation de Hill à quatre paramètres) issus des essais sur les témoins réalisés par deux laboratoires.

La gamme des CI<sub>50</sub> dépendra de la K<sub>d</sub> de la préparation de récepteurs et de la concentration du ligand radiomarqué utilisée par chaque laboratoire. Il est admis d'effectuer les ajustements appropriés pour la fourchette des CI<sub>50</sub> en fonction des conditions de mise en œuvre de la méthode d'essai.

### Démonstration des compétences du laboratoire

10. Voir les paragraphes 17 et 18 ainsi que le tableau 2 de la partie « **ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE LIAISON AU hrER** » de la présente Ligne directrice pour les essais. Chaque essai (liaison à saturation et liaison compétitive) se compose de trois essais indépendants (utilisant de nouvelles dilutions du récepteur, des produits chimiques et des réactifs) réalisés trois jours différents, chacun d'entre eux comportant trois réplicats.

**Détermination de la concentration de récepteur (hrER $\alpha$ )**

11. La concentration de récepteurs actifs varie légèrement en fonction des lots et des conditions de stockage. C'est pourquoi il convient de déterminer la concentration de récepteurs actifs du lot livré par le fournisseur. Cette étape permet d'obtenir la concentration exacte de récepteurs actifs au moment de l'essai.

12. Dans les mêmes conditions que l'essai de liaison compétitive, donc avec 0.5 nM de [<sup>3</sup>H]-œstradiol, des concentrations nominales de 0.1, 0.2, 0.4 et 0.6 nM de récepteur sont incubées en absence (liaison totale) et en présence (liaison non spécifique) d'œstradiol non marqué à 1  $\mu$ M. La liaison spécifique est calculée en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale, puis reportée graphiquement en fonction de la concentration nominale de récepteur. La concentration de récepteur pour laquelle la liaison spécifique correspond à 40 % du ligand radiomarqué ajouté permet de déduire la concentration de récepteur. C'est cette dernière qui est utilisée pour les expériences de liaison à saturation et de liaison compétitive. Souvent, cette condition sera remplie par une concentration finale de hrER de 0.2 nM.

13. Si le critère des 40 % échoue à plusieurs reprises, il faut chercher d'éventuelles erreurs dans le montage expérimental. L'incapacité à satisfaire le critère des 40 % peut suggérer que le lot de récepteurs recombinants contient très peu de sites actifs ; il faut alors envisager d'employer un autre lot.

**Essai à saturation**

14. Huit concentrations croissantes de [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol sont évaluées en triple exemplaire en respectant les trois conditions suivantes (voir tableau 2) :

- a. En absence de 17 $\beta$ -œstradiol non marqué et en présence d'ER. Cette condition permet de déterminer la liaison totale en mesurant la radioactivité des puits ne contenant que le [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol.
- b. En présence d'une concentration de 17 $\beta$ -œstradiol non marqué deux mille fois plus importante que celle du 17 $\beta$ -œstradiol radiomarqué et en présence d'ER. Cette condition vise à saturer les sites de liaison actifs avec le 17 $\beta$ -œstradiol non marqué et à déterminer la liaison non spécifique déduite de la radioactivité des puits. En effet, on considère que le reste d'œstradiol chaud (radiomarqué) capable de se lier au récepteur se fixe sur des sites non spécifiques, car l'œstradiol froid (non marqué) doit être en tel excès qu'il occupe tous les sites spécifiques disponibles sur les récepteurs.
- c. En absence de 17 $\beta$ -œstradiol non marqué et en absence d'ER (détermination de la radioactivité totale).

*Préparation des solutions de [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol, de 17 $\beta$ -œstradiol non marqué et de hrER $\alpha$ .*

Une solution de [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol à 40 nM est préparée à partir d'une solution mère de [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol à 1  $\mu$ M dans le DMSO dans laquelle on ajoute du DMSO jusqu'à obtenir 200 nM, puis de la solution tamponnée à température ambiante jusqu'à 40 nM. Cette solution à 40 nM est alors diluée avec de la solution tamponnée à température ambiante pour préparer la série de solutions de [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol allant de 0.313 à 40 nM (conformément à la colonne 12 du tableau 2).

15. Les concentrations d'essai finales, qui vont de 0.0313 à 4.0 nM, sont obtenues par ajout de 10  $\mu$ L des dilutions précédentes dans chaque puits d'une plaque microtitre 96 puits (voir tableaux 2 et 3). La préparation de la solution d'essai tamponnée, la caractérisation de la solution mère de [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol à partir de son activité spécifique ainsi que la préparation des dilutions et la détermination des concentrations

sont décrites en détail dans le protocole du CERI (2).

16. Les dilutions des solutions de  $17\beta$ -œstradiol non marqué sont préparées en ajoutant la solution d'essai tamponnée à la solution mère de  $17\beta$ -œstradiol à 1 nM de manière à obtenir huit concentrations croissantes allant d'abord de 0.625 à 80  $\mu$ M. Les concentrations d'essai finales, de 0.0625 à 4.0  $\mu$ M, sont obtenues par ajout de 10  $\mu$ L de ces dilutions dans chaque puits d'essai d'une plaque microtitre 96 puits servant à mesurer la liaison non spécifique (voir tableaux 2 et 3). La préparation des dilutions de  $17\beta$ -œstradiol non marqué est décrite en détail dans le protocole du CERI (2).

17. C'est la concentration de récepteur pour laquelle on obtient une liaison spécifique de  $40 \pm 10$  % qui est choisie pour l'essai (voir paragraphes 12-13). La solution de hrER $\alpha$  est préparée immédiatement avant l'essai avec de la solution d'essai tamponnée glaciale, une fois que tous les puits servant à déterminer la liaison totale, la liaison non spécifique et contenant le ligand chaud uniquement ont été préparés.

18. Les plaques microtitre 96 puits sont préparées conformément au tableau 2, avec 3 réplicats par concentration de [ $^3$ H]- $17\beta$ -œstradiol. La répartition des volumes de [ $^3$ H]- $17\beta$ -œstradiol, de  $17\beta$ -œstradiol non marqué, de solution tamponnée et de récepteur est indiquée dans le tableau 3.

**Tableau 2 : Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison à saturation**

	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10	11**	12**
	Pour mesurer la LT			Pour mesurer la LNS			Pour mesurer le ligand chaud seul				Dilutions de E2 non marqué pour les colonnes 4 à 6 de la plaque	Dilutions de [ <sup>3</sup> H] E2 pour les colonnes 1 à 9 de la plaque
<b>A</b>	0.0313 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + ER			0.0313 nM [3H] E2 + 0.0625 µM E2 + ER			0.0313 nM				0.625 µM	0.313 nM
<b>B</b>	0.0625 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + ER			0.0625 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + 0.125 µM E2 + ER			0.0625 nM				1.25 µM	0.625 nM
<b>C</b>	30.125 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + ER			0.125 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + 0.25 µM E2 + ER			0.125 nM				2.5 µM	1.25 nM
<b>D</b>	0.250 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + ER			0.250 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + 0.5 µM E2 + ER			0.250 nM				5 µM	2.5 nM
<b>E</b>	0.50 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + ER			0.50 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + 1 µM E2 + ER			0.50 nM				10 µM	5 nM
<b>F</b>	1.00 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + ER			1.00 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + 2 µM E2 + ER			1.00 nM				20 µM	10 nM
<b>G</b>	2.00 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + ER			2.00 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + 4 µM E2 + ER			2.00 nM				40 µM	20 nM
<b>H</b>	4.00 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + ER			4.00 nM [ <sup>3</sup> H] E2 + 8 µM E2 + ER			4.00 nM				80 µM	40 nM

LT : liaison totale,

LNS : liaison non spécifique

[<sup>3</sup>H] E<sub>2</sub> : [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol

E2 : 17β-œstradiol non marqué

\*Les concentrations indiquées sont les concentrations finales dans chaque puits.

\*\*Les dilutions de E2 non marqué et de [<sup>3</sup>H] E2 peuvent être préparées sur une autre plaque.

**Tableau 3. Volumes de réactif dans la plaque microtitre de l'essai de liaison à saturation**

Numéro de colonne		1	2	3	4	5	6	7*	8*	9*
Étapes de préparation		Puits LT			Puits LNS			Puits ligand chaud		
Volume d'éléments à verser dans le puits d'essai, et ordre d'ajout	Solution tamponnée	60 µL			50 µL			90 µL		
	E2 non marqué de la colonne 11 du tableau 2	-			10 µL			-		
	[ <sup>3</sup> H] E2 de la colonne 12 du tableau 2	10 µL			10 µL			10 µL		
	hrERα	30 µL			30 µL			-		
Volume d'essai total		100 µL			100 µL			100 µL		
Incubation		<b>APRÈS 2 HEURES DE RÉACTION PAR INCUBATION</b>						Quantification de la radioactivité immédiatement après préparation. Pas d'incubation		
Ajout de DCC à 0.4 %		<b>OUI</b>			<b>OUI</b>			<b>NON</b>		
Volume de DCC à 0.4 %		100 µL			100 µL			-		
Filtration		OUI			OUI			NON		
<b>MESURE DES DPM</b>										
Volume de quantification ajouté au mélange de scintillation		100 µL**			100 µL**			50 µL		

\* En cas d'utilisation d'un compteur à scintillation pour plaque microtitre pour mesurer les désintégrations par minute, le ligand chaud seul ne peut être préparé sur la même plaque que les puits servant à déterminer la LT et la LNS. Le ligand chaud seul est alors préparé sur une autre plaque.

\*\* Si le DCC est séparé par centrifugation, les 50 µL de surnageant doivent être analysés par comptage par scintillation liquide afin d'éviter la contamination par le DCC.

19. Les plaques d'essai microtitre servant à déterminer la liaison totale et la liaison non spécifique sont incubées à température ambiante (entre 22 et 28 °C) pendant deux heures.

#### Mesure du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol lié au hrERα

20. À l'issue des deux heures d'incubation, le [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol lié au hrERα est séparé du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol libre par ajout de 100 µL d'une suspension glaciale de DCC à 0.4 % dans chaque puits. Les plaques sont alors placées sur la glace pendant 10 minutes, puis le mélange réactionnel et la suspension de DCC sont passés sur un filtre pour plaque microtitre afin d'éliminer le DCC. On prélève alors 100 µL de filtrat, qui sont ajoutés au scintillateur liquide dans des flacons de CSL en vue d'établir les désintégrations par minute (dpm) de chaque flacon grâce au comptage par scintillation.

21. À défaut d'un filtre pour plaque microtitre, il est également possible d'éliminer le DCC par centrifugation. Les 50 µL de surnageant comprenant le [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol lié au hrERα sont alors prélevés très soigneusement pour éviter de contaminer les puits par contact avec le DCC, puis soumis au comptage par scintillation.

22. Le ligand chaud seul permet de définir les désintégrations par minute (dpm) du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol ajouté aux puits d'essai. La radioactivité est mesurée juste après la préparation des puits correspondants. Ces puits ne reçoivent pas de suspension de DCC, et leur contenu est transféré directement dans le scintillateur liquide. Ils indiquent la quantité de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol (exprimée en dpm) ajoutée à chaque série de puits pour la liaison totale et la liaison non spécifique.

### Essai de liaison compétitive

23. L'essai de liaison compétitive mesure les liaisons de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol en concentration fixe en présence de concentrations croissantes de produit chimique testé. Il requiert trois réplicats simultanés pour chaque concentration. En outre, trois essais non simultanés sont réalisés pour chaque produit chimique testé. L'essai nécessite au moins une plaque microtitre 96 puits.

#### *Témoins*

24. Le solvant et les témoins concomitants (substance œstrogénique de référence, ligand faible et non-ligand) doivent être inclus dans chaque expérience de l'essai. Pour chaque essai, une même plaque sert à établir les courbes pour toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins (ligand faible et non-ligand). Toutes les autres plaques doivent contenir (i) une concentration élevée (remplacement maximal, quand le ligand remplace presque entièrement le ligand radiomarqué) et une concentration moyenne (correspondant environ à la CI<sub>50</sub>) d'E2 et du ligand faible en triple exemplaire ; (ii) les témoins avec solvant et des ligands non spécifiques, chacun en triple exemplaire. Les procédures de préparation de la solution d'essai tamponnée, des solutions de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol, de hrERα et du produit chimique testé sont décrites en détail dans le protocole du CERI (2).

#### *- Témoin avec solvant :*

25. Le témoin avec solvant indique que ce dernier n'interagit pas avec le système d'essai et permet en outre de mesurer la liaison totale (LT). De préférence, on choisira le DMSO comme solvant. Si la concentration maximale du produit chimique testé n'est pas soluble dans le DMSO, il est aussi possible d'avoir recours à l'éthanol. La concentration de DMSO dans les puits en fin d'essai doit être 2.05 %, mais pourra aller jusqu'à 2.5 % si le produit chimique testé n'est pas assez soluble. Les concentrations de DMSO supérieures à 2.5 % sont proscrites car les concentrations de solvant plus élevées interfèrent avec l'essai. Pour les produits chimiques testés insolubles dans le DMSO mais solubles dans l'éthanol, on pourra utiliser jusqu'à 2 % d'éthanol dans l'essai sans que cela crée d'interférence.

#### *- Témoin avec solution tamponnée :*

26. Le témoin avec solution tamponnée (TST) contient tous les éléments de l'essai sauf le solvant et le produit chimique testé. Les résultats du TST sont comparés à ceux du témoin avec solvant afin de vérifier que le solvant utilisé ne perturbe pas le système d'essai.

#### *- Ligand fort (substance œstrogénique de référence)*

27. Le 17β-œstradiol (CAS 50-28-2) est le ligand endogène qui présente une forte affinité de liaison aux ER de type alpha. Il convient de tracer une courbe de référence pour le 17β-œstradiol non marqué pour chaque essai de liaison compétitive aux hrERα, afin d'évaluer la variabilité des essais répétés au fil du temps dans le même laboratoire. Huit solutions de 17β-œstradiol non marqué sont préparées dans du DMSO et de la

solution d'essai tamponnée afin d'obtenir les concentrations finales suivantes dans les puits d'essai :  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-8.5}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-9.5}$ ,  $10^{-10}$  et  $10^{-11}$  M. Ces concentrations permettent de tracer la courbe de référence. La concentration maximale de  $17\beta$ -œstradiol non marqué (1  $\mu$ M) sert également d'indicateur de liaison non spécifique (LNS) ; elle est donc codée « LNS » dans le tableau 4, même si elle fait également partie de la courbe de référence.

*- Ligand faible*

28. Un ligand faible (noréthynodrel [CAS68-23-5] ou noréthindrone [CAS 68-22-4]) est inclus pour démontrer la sensibilité de chaque expérience et évaluer la variabilité au fil des répétitions de l'essai. Huit solutions de ligand faible sont préparées dans du DMSO et de la solution d'essai tamponnée afin d'obtenir les concentrations finales suivantes dans les puits d'essai :  $10^{-4.5}$ ,  $10^{-5.5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-6.5}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-7.5}$ ,  $10^{-8}$  et enfin  $10^{-9}$  M.

*- Non-ligand*

29. On fera appel à l'octyltriéthoxysilane (OTES, CAS 2943-75-1) pour servir de témoin négatif (non-ligand). Ce composé permet de vérifier que tel qu'il est mis en œuvre, l'essai détermine les produits chimiques testés qui ne se lient pas au hrER $\alpha$ . Huit solutions de non-ligand sont préparées dans du DMSO et de la solution d'essai tamponnée afin d'obtenir les concentrations finales suivantes dans les puits d'essai :  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  et  $10^{-10}$  M. Il est aussi possible d'avoir recours au phtalate de dibutyle (DBP, CAS 84-72-2) comme non-ligand, mais en limitant la concentration maximale analysée à  $10^{-4}$  M. En effet, il est attesté que la solubilité maximale du DBP dans l'essai s'élève à  $10^{-4}$  M.

*Concentration de hrER $\alpha$*

30. C'est la quantité de récepteur pour laquelle on obtient une liaison spécifique de  $40 \pm 10$  % qui est choisie pour l'essai (voir paragraphes 12–13 de l'annexe 3). La solution de hrER $\alpha$  est préparée par dilution des hrER $\alpha$  fonctionnels dans de la solution d'essai tamponnée glaciale, juste avant son utilisation.

*[ $^3$ H]- $17\beta$ -œstradiol*

31. La concentration finale de [ $^3$ H]- $17\beta$ -œstradiol dans les puits d'essai doit être 0.5 nM.

*Produits chimiques testés*

32. Un premier essai s'impose pour déterminer la limite de solubilité de chaque produit chimique testé ainsi que la fourchette de concentrations qui convient pour l'essai. La limite de solubilité de chaque produit chimique testé est d'abord déterminée dans le solvant, puis confirmée dans les conditions de l'essai. La concentration finale utilisée dans l'essai ne doit pas dépasser 1 mM. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur s'effectue avec un témoin du solvant et une série logarithmique d'au moins huit dilutions de la concentration maximale acceptable (p.ex. 1 mM ou moins, selon la limite de solubilité). On relève alors l'apparition d'un trouble ou d'un précipité (voir aussi le paragraphe 35 de l'annexe 3). Dès que l'ordre de grandeur convenant à l'essai est établi, le produit chimique est testé sous forme d'une série de huit concentrations en série logarithmique dont les intervalles sont définis par l'essai de détermination de l'ordre de grandeur précédent. S'il y a lieu, on pourra ajuster plus finement les concentrations testées dans les deuxième et troisième expériences de façon à mieux caractériser la courbe concentration-réponse.

33. Les dilutions du produit chimique testé sont préparées dans le solvant approprié (voir paragraphe 25 de l'annexe 3). Si la concentration maximale du produit chimique testé n'est soluble ni dans le DMSO, ni dans l'éthanol, et si l'ajout de solvant supplémentaire pouvait se traduire par un dépassement de la concentration

maximale de solvant acceptable dans le puits en fin d'essai, c'est la concentration immédiatement inférieure qui fait office de concentration maximale. Le cas échéant, il est possible d'ajouter une concentration supplémentaire au début de la série de concentrations, les autres concentrations demeurant inchangées.

34. On observera attentivement les puits au moment d'y verser les solutions de produit chimique testé, car cet ajout peut provoquer un précipité. Les données relatives à tous les puits qui contiennent un précipité sont exclues de l'ajustement des courbes, et la raison de cette exclusion est consignée.

35. Si d'autres sources fournissent des données sur le  $\log(CI_{50})$  d'un produit chimique testé, il peut être judicieux de répartir les dilutions géométriquement autour du  $\log(CI_{50})$  attendu (p.ex. à 0.5 unité logarithmique). Les résultats finaux doivent correspondre à une fourchette de concentrations suffisamment étendue de part et d'autre du  $\log(CI_{50})$ , comprenant le « sommet » et la « base » de la courbe de liaison afin de pouvoir la caractériser correctement.

#### *Organisation de la plaque d'essai*

36. Les plaques microtitre étiquetées doivent inclure six répliquats respectivement pour le témoin avec solvant, la concentration maximale de substance œstrogénique de référence (E2) servant aussi d'indicateur de liaison non spécifique (LNS) et le témoin avec solution tamponnée, ainsi que les huit concentrations du témoin non ligand (octyltriéthoxysilane), les sept concentrations inférieures de la substance œstrogénique de référence (E2), les huit concentrations du ligand faible (noréthynodrel or noréthindrone) et les huit concentrations de chaque produit chimique testé (PCT). Un exemple d'organisation de la plaque d'essai pour obtenir des courbes complètes à partir de toutes les concentrations de la substance œstrogénique de référence et des témoins est fourni ci-dessous dans le tableau 4. Des plaques microtitre supplémentaires sont utilisées pour le produit chimique testé, et comprennent aussi les témoins suivants : (i) une concentration élevée (remplacement maximal) et une concentration moyenne (correspondant environ à la  $CI_{50}$  d'E2 et du ligand faible, en triple exemplaire ; (ii) le témoin avec solvant (liaison totale) et les puits pour la LNS, en six répliquats (tableau 5). Un exemple d'organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive de trois produits chimiques testés inconnus est disponible dans l'appendice 3 de l'annexe 3. Les concentrations indiquées dans cette représentation ainsi que dans les tableaux 4 et 5 font référence aux concentrations finales mises en œuvre dans chaque puits d'essai. La concentration maximale d'E2 doit s'élever à  $1 \times 10^{-7}$  M, tandis que pour le ligand faible, c'est la concentration maximale de la plaque 1 qui est utilisée. Le laboratoire détermine la  $CI_{50}$  à partir de sa base de données historiques. Cette valeur doit être similaire à celle observée dans les études de validation (voir tableau 1).

**Tableau 4 : Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive<sup>1,2</sup>, courbes concentration-réponse complètes pour la substance œstrogénique de référence et les témoins (plaque 1)**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Témoin avec solution tamponnée et témoin positif (E2)			Témoin faiblement positif (Noréthynodrel)			Témoin négatif (OTES)			LT et LNS		
<b>A</b>	Blanc *			$1 \times 10^{-9}$ M			$1 \times 10^{-10}$ M			LT (témoin du solvant) (2.05 % de DMSO)		
<b>B</b>	$1 \times 10^{-11}$ M			$1 \times 10^{-8}$ M			$1 \times 10^{-9}$ M					
<b>C</b>	$1 \times 10^{-10}$ M			$1 \times 10^{-7.5}$ M			$1 \times 10^{-8}$ M			LNS ( $10^{-6}$ M E2)		
<b>D</b>	$1 \times 10^{-9.5}$ M			$1 \times 10^{-7}$ M			$1 \times 10^{-7}$ M					
<b>E</b>	$1 \times 10^{-9}$ M			$1 \times 10^{-6.5}$ M			$1 \times 10^{-6}$ M			Témoin avec solution tamponnée		
<b>F</b>	$1 \times 10^{-8.5}$ M			$1 \times 10^{-6}$ M			$1 \times 10^{-5}$ M					
<b>G</b>	$1 \times 10^{-8}$ M			$1 \times 10^{-5.5}$ M			$1 \times 10^{-4}$ M			Blanc (E2 chaud)**		
<b>H</b>	$1 \times 10^{-7}$ M			$1 \times 10^{-4.5}$ M			$1 \times 10^{-3}$ M					

<sup>1</sup> Organisation des échantillons pour la plaque microtitre standard à analyser pour chaque essai.

<sup>2</sup> Notez que cette plaque microtitre est préparée avec les dilutions obtenues dans la plaque de dilution conformément aux normes des sections précédentes.

Dans cet exemple, le ligand faible est le noréthynodrel (NE).

\* Blanc réel, puits non utilisés.

\*\* Blanc non utilisé pendant l'incubation, mais servant à confirmer la radioactivité totale ajoutée.

**Tableau 5 : Organisation de la plaque microtitre pour l'essai de liaison compétitive, plaques supplémentaires pour les produits chimiques testés (PCT) et les témoins de la plaque**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Produit chimique testé-1 (PCT-1)			Produit chimique testé-2 (PCT-2)			Produit chimique testé-3 (PCT-3)			Témoins		
<b>A</b>	PCT-1 ( $1 \times 10^{-10}$ M)			PCT-2 ( $1 \times 10^{-10}$ M)			PCT-3 ( $1 \times 10^{-10}$ M)			E2 ( $1 \times 10^{-7}$ M)		
<b>B</b>	PCT-1 ( $1 \times 10^{-9}$ M)			PCT-2 ( $1 \times 10^{-9}$ M)			PCT-3 ( $1 \times 10^{-9}$ M)			E2 (CI <sub>50</sub> )		
<b>C</b>	PCT-1 ( $1 \times 10^{-8}$ M)			PCT-2 ( $1 \times 10^{-8}$ M)			PCT-3 ( $1 \times 10^{-8}$ M)			NE ( $1 \times 10^{-4.5}$ M)		
<b>D</b>	PCT-1 ( $1 \times 10^{-7}$ M)			PCT-2 ( $1 \times 10^{-7}$ M)			PCT-3 ( $1 \times 10^{-7}$ M)			NE (CI <sub>50</sub> )		
<b>E</b>	PCT-1 ( $1 \times 10^{-6}$ M)			PCT-2 ( $1 \times 10^{-6}$ M)			PCT-3 ( $1 \times 10^{-6}$ M)			LNS ( $10^{-6}$ M E2)		
<b>F</b>	PCT-1 ( $1 \times 10^{-5}$ M)			PCT-2 ( $1 \times 10^{-5}$ M)			PCT-3 ( $1 \times 10^{-5}$ M)					
<b>G</b>	PCT-1 ( $1 \times 10^{-4}$ M)			PCT-2 ( $1 \times 10^{-4}$ M)			PCT-3 ( $1 \times 10^{-4}$ M)			LT (témoin avec solvant)		
<b>H</b>	PCT-1 ( $1 \times 10^{-3}$ M)			PCT-2 ( $1 \times 10^{-3}$ M)			PCT-3 ( $1 \times 10^{-3}$ M)					

*Dans cet exemple, le ligand faible est le noréthynodrel (NE)*

*Mise en œuvre de l'essai de liaison compétitive*

37. Tous les puits, à l'exception de ceux qui servent à déterminer la liaison totale et les puits à blanc (avec le ligand chaud) indiqués dans le tableau 6, reçoivent 50 µL de solution d'essai tamponnée, ensuite mélangée avec 10 µL, selon le cas, de témoin avec solvant, de substance œstrogénique de référence (E2), de ligand faible, de non-ligand et de produit chimique testé, puis 10 µL d'une solution de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol à 5 nM. En dernier lieu, les puits de chaque plaque reçoivent 30 µL de solution de récepteur glaciale, et sont agités modérément. La solution de hrERα est le dernier réactif ajouté. Les plaques d'essai microtitre sont alors incubées à température ambiante (entre 22 et 28 °C) pendant deux heures.

Tableau 6 : Volume des éléments de l'essai de liaison compétitive au hrER, plaques microtitre

<i>Étapes de préparation par colonne</i>		Puits autres que LT	Puits LT	Blanc (E2 chaud)
Volume d'éléments à verser dans le puits d'essai, et ordre d'ajout	Solution d'essai tamponnée à température ambiante	50 µL	60 µL	90 µL
	E2 non marqué, ligand faible, non-ligand, solvant et produits chimiques testés*	10 µL	-	-
	[ <sup>3</sup> H]-17β-œstradiol en quantité suffisante pour une concentration finale de 0.5 nM (soit 5 nM)	10 µL	10 µL	10 µL
	Concentration de hrERα préétablie (voir paragraphes 12-13)	30 µL	30 µL	-
Volume total dans chaque puits d'essai		100 µL	100 µL	100 µL

\* Préparés manière à obtenir une concentration finale de solvant acceptable

38. Le [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol lié au hrERα est séparé du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol libre en ajoutant 100 µL d'une suspension glaciale de DCC dans chaque puits, puis quantifié en suivant la méthode décrite dans les paragraphes 21-23 de l'annexe 3 relativement à l'essai de liaison à saturation.

39. Les puits G10 à G12 et H10 à H12 (« blanc (E2 chaud) » dans le tableau 4) fournissent les désintégrations par minute du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol dans 10 µL. Les aliquotes de 10 µL sont versées directement dans le scintillateur liquide.

### Critères d'acceptabilité

#### *Essai de liaison à saturation*

40. La courbe de liaison spécifique doit atteindre un plateau pour les concentrations les plus élevées de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol, le cas échéant, ce qui traduit la saturation des hrERα avec le ligand.

41. Il faut que la liaison spécifique induite par le [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol à 0.5 nM corresponde à une radioactivité égale à 30 à 50 % de la moyenne de la radioactivité totale mesurée dans tous les essais. On peut occasionnellement admettre quelques valeurs en dehors de cette fourchette, mais si les résultats de l'essai la dépassent régulièrement ou si un essai donné livre des résultats très éloignés de cette fourchette, il convient d'ajuster la concentration de protéine et de répéter l'essai de liaison à saturation.

42. Les données doivent aboutir à une représentation de Scatchard linéaire.

43. La liaison non spécifique ne doit pas être excessive : elle est généralement inférieure à 35 % de la liaison totale. Le ratio de ces liaisons pourra néanmoins parfois dépasser ce chiffre s'agissant de mesurer des désintégrations par minutes très faibles pour la concentration d'essai de 17β-œstradiol radiomarqué la plus basse.

#### *Essai de liaison compétitive*

44. Des concentrations croissantes de 17β-œstradiol non marqué doivent déplacer le [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol des récepteurs selon un modèle de liaison compétitive sur un seul site.

45. Il faut que la  $CI_{50}$  de la substance œstrogénique de référence (le  $17\beta$ -œstradiol) soit environ égale à la concentration molaire de  $[^3H]$ - $17\beta$ -œstradiol plus la  $K_d$  établie grâce à l'essai de liaison à saturation.

46. La liaison spécifique totale doit rester cohérente et s'élever à  $40 \pm 10 \%$  lorsque la concentration moyenne de la radioactivité totale ajoutée à chaque puits vaut 0.5 nM pour tous les essais. On peut occasionnellement admettre quelques valeurs en dehors de cette fourchette, mais si les résultats de l'essai la dépassent régulièrement ou si un essai donne des résultats très éloignés de cette fourchette, il convient d'ajuster la concentration de protéine.

47. Le solvant ne doit pas modifier la sensibilité ou la reproductibilité de l'essai. Les résultats du témoin avec solvant (puits TS) sont comparés à ceux du témoin avec solution tamponnée (TST) afin de vérifier que le solvant utilisé ne perturbe pas le système d'essai. Quand le solvant n'a aucun effet sur l'essai, les résultats correspondant au TS et au TST sont comparables.

48. Le non-ligand ne doit pas remplacer plus de 25 % du  $[^3H]$ - $17\beta$ -œstradiol lié au hrER $\alpha$  à des concentrations allant jusqu'à  $10^{-3}$  M (OTES) ou  $10^{-4}$  M (DBP).

49. Des critères de performance ont été définis pour la substance œstrogénique de référence et pour les deux ligands faibles (p.ex. noréthynodrel ou noréthindrone) à partir des données de l'étude de validation de l'essai de liaison au hrER du CERI (annexe N de la référence 2). Les intervalles de confiance à 95 % fournis découlent des valeurs moyenne  $\pm$  ET (n) obtenues dans l'ensemble des essais sur les témoins effectués par quatre laboratoires participant à l'étude de validation. Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés pour les paramètres d'ajustement des courbes (p.ex. sommet, base, pente de Hill et  $\log CI_{50}$ ) correspondant à la substance œstrogénique de référence et aux ligands faibles ainsi que pour le  $\log_{10} ALR$  des ligands faibles par rapport à la substance œstrogénique de référence. Le tableau 1 présente les fourchettes attendues pour les paramètres d'ajustement des courbes, qui peuvent faire office de critères de performance. En pratique, la fourchette de la  $CI_{50}$  peut varier légèrement en fonction de la  $K_d$  déduite de la préparation de récepteurs déterminée par les expériences et en fonction de la concentration d'essai du ligand.

50. Aucun critère de performance n'a été établi pour les paramètres d'ajustement des courbes correspondant aux produits chimiques testés du fait de la grande diversité des composés potentiellement testés ainsi que des affinités et résultats correspondants (p.ex. ajustement complet, partiel ou nul des courbes). On fera toutefois appel à un avis professionnel pour analyser les résultats de chaque essai sur une substance. Il convient d'avoir recours à une fourchette de concentrations d'essai suffisante pour définir clairement le sommet de la courbe de liaison compétitive (p.ex. pour induire 90 à 100 % de liaison). La variabilité entre les répliqués de chaque concentration du produit chimique testé et entre les trois essais non simultanés doit rester raisonnable et défendable sur le plan scientifique. Il est nécessaire que les témoins utilisés pour chaque essai sur un produit chimique testé soient proches des mesures de la performance documentées pour cette méthode du CERI, et en harmonie avec les données historiques obtenues pour les témoins par chaque laboratoire.

## ANALYSE DES DONNÉES

**Essai de liaison à saturation**

51. Cet essai mesure la liaison totale et la liaison non spécifique. Ces valeurs permettent de calculer la liaison spécifique induite par des concentrations croissantes de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol à l'équilibre, en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale. La courbe reportant la liaison spécifique en fonction de la concentration de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol doit atteindre un plateau pour la liaison spécifique maximale, qui indique la saturation des hrERα par le [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol. De plus, l'analyse des données documente la liaison du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol à un site de liaison unique à haute affinité. Il faut que la courbe de liaison à saturation présente les liaisons non spécifique, totale et spécifique. Une régression non linéaire (p.ex. BioSoft ; McPherson, 1985 ; Motulsky, 1995) permet d'approfondir l'analyse des données, et les résultats sont finalement présentés sous forme d'une représentation de Scatchard.

52. L'analyse des données doit déterminer la  $B_{\max}$  et la  $K_d$  en se fondant uniquement sur les données de liaison totale, étant supposé que la liaison non spécifique est linéaire, à moins de justifier le recours à une autre méthode. Par ailleurs, on détermine le meilleur ajustement des courbes à l'aide d'une analyse de régression solide, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. La méthode choisie pour cette analyse de régression solide sera indiquée. On appliquera toujours une correction relative à la perte de ligand (p.ex. avec la méthode de Swillens, 1995) pour déterminer la  $B_{\max}$  et la  $K_d$  à partir des données de liaison à saturation.

**Essai de liaison compétitive**

53. La courbe de liaison compétitive représente la liaison spécifique du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol en fonction de la concentration (en log10) du compétiteur. La concentration de produit chimique testé qui inhibe 50 % de liaison spécifique maximale du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol correspond à la  $CI_{50}$ .

54. Des estimations des  $\log(CI_{50})$  des témoins positifs (p.ex. substance œstrogénique de référence et ligand faible) sont obtenues grâce à un logiciel approprié d'ajustement de courbe par méthode non linéaire d'après une équation de Hill à quatre paramètres (p.ex. BioSoft ; McPherson, 1985 ; Motulsky, 1995). Ces ajustements se font sans imposer de limites au sommet, à la base, à la pente et au  $\log(CI_{50})$  des courbes. Le meilleur ajustement des courbes est établi grâce à une analyse de régression solide, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. Aucune correction n'est effectuée pour la perte de ligand. Après l'analyse initiale, chaque courbe de liaison est examinée pour vérifier qu'elle est bien ajustée au modèle. L'affinité de liaison relative (ALR) du ligand faible est exprimée en pourcentage à partir du rapport entre le  $\log(CI_{50})$  du ligand faible et le  $\log(CI_{50})$  du 17β-œstradiol. Les résultats des témoins positifs et du témoin non ligand sont évalués à partir des mesures de la performance de l'essai indiquées dans les paragraphes 44-49 de l'annexe 3.

55. Les données obtenues pour tous les produits chimiques testés doivent être analysées par étape pour veiller à l'évaluation appropriée des résultats et à la classification correcte de chaque courbe de liaison compétitive. Ainsi, pour chaque essai sur une substance, il est d'abord recommandé d'effectuer une analyse des données normalisée identique à celle utilisée pour la substance œstrogénique de référence et les témoins avec ligand de faible affinité (voir paragraphe 54 de l'annexe 3). Cette étape est suivie d'un examen technique de l'ajustement des paramètres de la courbe et d'un examen visuel pour déterminer dans quelle mesure les données correspondent à la courbe de liaison compétitive obtenue pour chaque essai. Cet

examen technique repose sur trois observations indiquant que l'essai et les analyses ont été réalisés correctement : une baisse du pourcentage de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol lié aux sites spécifiques en fonction de la concentration, une faible variabilité entre les réplicats techniques de chaque concentration de produit chimique testé et la cohérence des paramètres d'ajustement entre les trois essais.

**Interprétation des données**

56. Sous réserve du respect de l'ensemble des critères d'acceptabilité, un produit chimique testé est considéré comme ligand du hrERα si sa courbe de liaison peut être ajustée et si le point le plus bas de la courbe de réponse obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison inférieure à 50 % (graphique 1).

57. Sous réserve du respect de l'ensemble des critères d'acceptabilité, un produit chimique testé est considéré comme non-ligand du hrERα si :

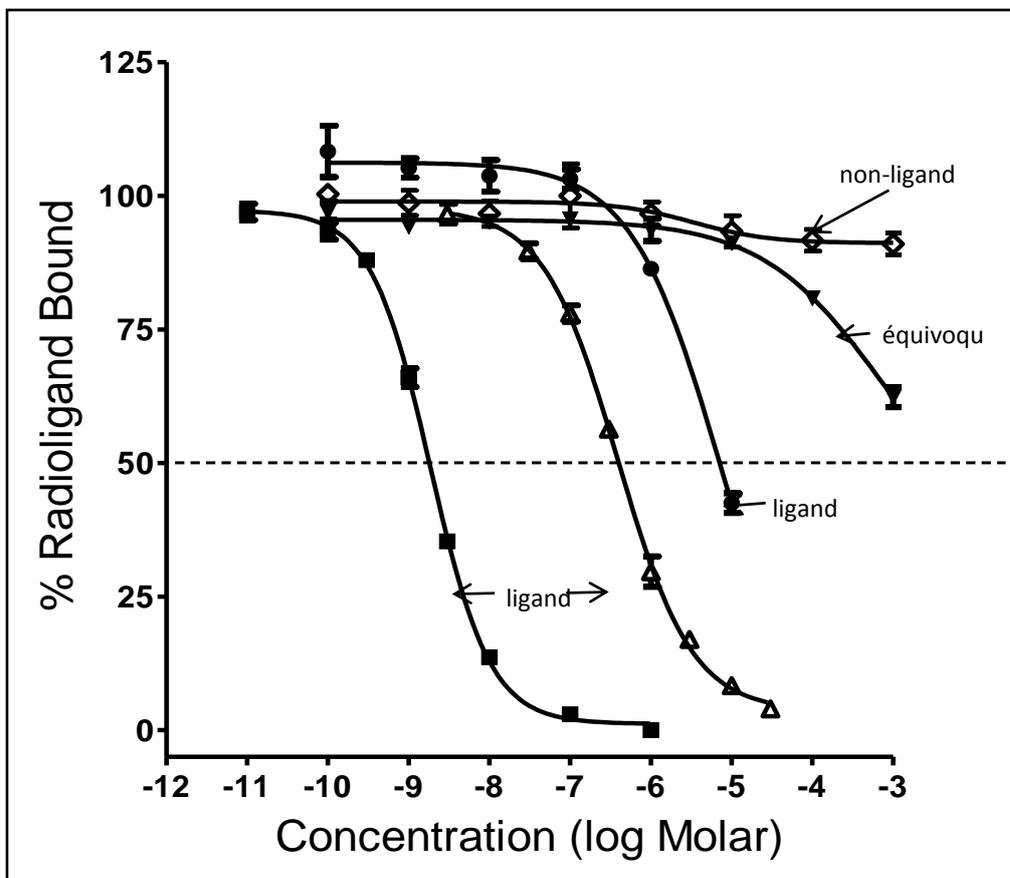
- sa courbe de liaison peut être ajustée et si le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison supérieure à 75 %, ou
- sa courbe de liaison ne peut pas être ajustée et si la moyenne des pourcentages de liaison non lissés de tous les groupes de concentration de l'essai est supérieure à 75 %.

58. Les produits chimiques testés sont considérés comme équivoques si aucune des conditions qui précèdent n'est satisfaite (p.ex. le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée correspond à une liaison située entre 76 et 51 %).

**Tableau 7. Critère de classification d'un produit chimique testé fondée sur sa courbe de liaison compétitive**

Classification	Critères
Ligand <sup>a</sup>	Il est possible d'ajuster la courbe. <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Le point le plus bas de la courbe de réponse obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison inférieure à 50 %.</b></li> </ul>
Non-ligand <sup>b</sup>	S'il est possible d'ajuster la courbe, <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée obtenue pour la gamme de données correspond à une liaison supérieure à 75 %.</b></li> </ul> S'il n'est pas possible d'ajuster la courbe, <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>la moyenne des pourcentages de liaison non lissés de tous les groupes de concentration de l'essai est supérieure à 75 %.</b></li> </ul>
Équivoque <sup>c</sup>	Essai évaluable qui ne peut être classé ni comme ligand, ni comme non-ligand (P.ex. le point le plus bas de la courbe de réponse ajustée correspond à une liaison située entre 76 et 51 %.)

Graphique 1. Exemples de classification d'un produit chimique testé grâce à la courbe de liaison compétitive



$\% \text{ Radioligand bound} = \% \text{ de ligand radiomarqué lié} / \text{Concentration (log Molar)} = \text{Concentration (logM)}$

59. Les différents essais réalisés par un laboratoire sur une substance sont combinés en attribuant des valeurs numériques à chaque essai et en calculant la moyenne de ces valeurs, comme l'indique le tableau 8. Les résultats combinés des essais de chaque laboratoire sont alors comparés à la classification attendue pour chaque produit chimique testé.

**Tableau 8. Méthode de classification d'un produit chimique testé à partir de plusieurs essais dans un même laboratoire**

Attribution d'une valeur à chaque essai :	
Classification	Valeur numérique
Ligand	2
Équivoque	1
Non-ligand	0
Classification selon la moyenne des valeurs numériques de toutes les expériences :	
Classification	Valeur numérique
Ligand	Moyenne $\geq 1.5$
Équivoque	$0.5 \leq \text{moyenne} < 1.5$
Non-ligand	Moyenne $< 0.5$

## RAPPORT D'ESSAI

60. Voir le paragraphe 24 de la partie « ÉLÉMENTS DE LA MÉTHODE D'ESSAI DE LIAISON AU hrER » de la présente Ligne directrice pour les essais.

**Appendice 1 : Liste de termes**

**DCC** : *dextran-coated charcoal* (charbon enrobé de dextrane).

**E2** : 17 $\beta$ -œstradiol non marqué (inerte).

**Essai** : série complète d'expériences simultanées dans les puits d'une plaque microtitre livrant l'ensemble des données nécessaires pour caractériser l'affinité de liaison au hrER $\alpha$  d'un produit chimique testé, soit la quantité totale de [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol ajoutée dans un puits, la liaison maximale au hrER $\alpha$  du [<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -œstradiol, la liaison non spécifique et la liaison totale pour diverses concentrations de le produit chimique testé. Un essai peut reposer sur un seul puits d'essai (réplicat) par concentration, mais dans la mesure où le présent protocole exige des expériences en triple exemplaire, un essai fait appel à trois puits d'essai par concentration. De plus, le présent protocole impose de réaliser trois essais indépendants (non simultanés) par produit chimique.

**[<sup>3</sup>H] E2** : 17 $\beta$ -œstradiol radiomarqué au tritium.

**hrER $\alpha$**  : récepteur des œstrogènes alpha recombinant humain (domaine de liaison du ligand).

**Réplicat** : un des multiples puits qui contiennent les mêmes éléments, aux mêmes concentrations, et sont testés simultanément dans un même essai. Le présent protocole prévoit que chaque concentration du produit chimique testé soit soumise à l'essai en triple exemplaire, c'est-à-dire que trois répliquats de chacune d'elle sont testés simultanément.

**Solution d'essai tamponnée** : solution de 10 mM de Tris-HCl à pH 7.4, avec 1 mM d'EDTA, 1 mM d'EGTA, 1 mM de NaVO<sub>3</sub>, 10 % de glycérol, 0.2 mM de leupeptine, 1 mM de dithiothréitol et 10 mg/mL d'albumine sérique bovine.

## Appendice 2 Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de solution mère de hrER (µL)	Volume de solution tamponnée (µL)	Volume de traceur (E2 chaud) (µL)	Volume issu de la plaque de dilution (µL)	Volume final (µL)	Concentration finale du compétiteur (M)
S	A1	1	blanc	B	B1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	blanc	B	B2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	blanc	B	B3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	E2 froid	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B2	2	E2 froid	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	B3	3	E2 froid	S	S1	1.00E-10	30	50	10	10	100	1.0E-11
S	C1	1	E2 froid	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C2	2	E2 froid	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	C3	3	E2 froid	S	S2	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	D1	1	E2 froid	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D2	2	E2 froid	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	D3	3	E2 froid	S	S3	3.16E-09	30	50	10	10	100	3.2E-10
S	E1	1	E2 froid	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E2	2	E2 froid	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	E3	3	E2 froid	S	S4	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	F1	1	E2 froid	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F2	2	E2 froid	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	F3	3	E2 froid	S	S5	3.16E-08	30	50	10	10	100	3.2E-09
S	G1	1	E2 froid	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G2	2	E2 froid	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	G3	3	E2 froid	S	S6	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	H1	1	E2 froid	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H2	2	E2 froid	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	H3	3	E2 froid	S	S7	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	A4	1	noréthynodrel	NE	LF1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A5	2	noréthynodrel	NE	LF1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	A6	3	noréthynodrel	NE	LF1	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B4	1	noréthynodrel	NE	LF2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B5	2	noréthynodrel	NE	LF2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	B6	3	noréthynodrel	NE	LF2	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C4	1	noréthynodrel	NE	LF3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C5	2	noréthynodrel	NE	LF3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	C6	3	noréthynodrel	NE	LF3	3.16E-07	30	50	10	10	100	3.2E-08
S	D4	1	noréthynodrel	NE	LF4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D5	2	noréthynodrel	NE	LF4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D6	3	noréthynodrel	NE	LF4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E4	1	noréthynodrel	NE	LF5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E5	2	noréthynodrel	NE	LF5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	E6	3	noréthynodrel	NE	LF5	3.16E-06	30	50	10	10	100	3.2E-07
S	F4	1	noréthynodrel	NE	LF6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F5	2	noréthynodrel	NE	LF6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F6	3	noréthynodrel	NE	LF6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06

S	G4	1	noréthynodrel	NE	LF7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G5	2	noréthynodrel	NE	LF7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06
S	G6	3	noréthynodrel	NE	LF7	3.16E-05	30	50	10	10	100	3.2E-06

## Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de solution mère de hrER (µL)	Volume de solution tamponnée (µL)	Volume de traceur (E2 chaud) (µL)	Volume issu de la plaque de dilution (µL)	Volume final (µL)	Concentration finale du compétiteur (M)
S	H4	1	noréthynodrel	NE	LF8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H5	2	noréthynodrel	NE	LF8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	H6	3	noréthynodrel	NE	LF8	3.16E-04	30	50	10	10	100	3.2E-05
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
S	H7	1	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H8	2	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
S	A10	1	liaison totale	LT	LT1	-	30	60	10	-	100	-
S	A11	2	liaison totale	LT	LT2	-	30	60	10	-	100	-
S	A12	3	liaison totale	LT	LT3	-	30	60	10	-	100	-
S	B10	4	liaison totale	LT	LT4	-	30	60	10	-	100	-
S	B11	5	liaison totale	LT	LT5	-	30	60	10	-	100	-
S	B12	6	liaison totale	LT	LT6	-	30	60	10	-	100	-
S	C10	1	E2 froid (élevé)	LNS	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C11	2	E2 froid (élevé)	LNS	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	C12	3	E2 froid (élevé)	LNS	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D10	4	E2 froid (élevé)	LNS	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D11	5	E2 froid (élevé)	LNS	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	D12	6	E2 froid (élevé)	LNS	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
S	E10	1	Témoin tampon	TST	TST1	-	-	100	-	-	100	-
S	E11	2	Témoin tampon	TST	TST2	-	-	100	-	-	100	-
S	E12	3	Témoin tampon	TST	TST3	-	-	100	-	-	100	-
S	F10	4	Témoin tampon	TST	TST4	-	-	100	-	-	100	-

S	F11	5	Témoin tampon	TST	TST5	-	-	100	-	-	100	-
S	F12	6	Témoin tampon	TST	TST6	-	-	100	-	-	100	-
S	G10*	1	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H1	-	90	-	10	-	100	-
S	G11*	2	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H2	-	90	-	10	-	100	-
S	G12*	3	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H3	-	90	-	10	-	100	-
S	H10*	4	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H4	-	90	-	10	-	100	-
S	H11*	5	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H5	-	90	-	10	-	100	-
S	H12	6	Blanc (E2 chaud)	Chaud	H6	-	90	-	10	-	100	-

\*Veuillez noter que les puits codés « chaud » sont vides pendant l'incubation. Les 10 µL qui y sont ensuite ajoutés ne servent qu'au comptage par scintillation.

### Organisation des puits pour l'essai de liaison compétitive

Plaque	Position	Réplicat	Type de puits	Code du puits	Code de la concentration	Concentration initiale du compétiteur (M)	Volume de solution mère de hrER (µL)	Volume de solution tamponnée (µL)	Volume de traceur (E2 chaud) (µL)	Volume issu de la plaque de dilution (µL)	Volume final (µL)	Concentration finale du compétiteur (M)
P1	A1	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A2	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A3	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B1	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B2	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B3	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C1	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C2	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C3	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D1	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D2	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D3	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E1	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E2	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E3	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F1	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F2	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F3	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G1	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G2	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G3	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H1	1	Prod. chim. testé 1	PCT1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H2	2	Prod. chim. testé 1	PCT1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H3	3	Prod. chim. testé 1	PCT1	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A4	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A5	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A6	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B4	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B5	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B6	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C4	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C5	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C6	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D4	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07

P1	D5	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D6	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E4	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E5	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E6	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F4	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F5	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F6	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G4	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G5	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G6	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H4	1	Prod. chim. testé 2	PCT2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H5	2	Prod. chim. testé 2	PCT2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H6	3	Prod. chim. testé 2	PCT2	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A7	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A8	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	A9	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	1	1.00E-09	30	50	10	10	100	1.0E-10
P1	B7	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B8	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	B9	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	2	1.00E-08	30	50	10	10	100	1.0E-09
P1	C7	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C8	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	C9	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	3	1.00E-07	30	50	10	10	100	1.0E-08
P1	D7	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D8	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	D9	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	4	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.0E-07
P1	E7	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E8	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E9	3	Prod. chim. testé 3	PCT3	5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F7	1	Prod. chim. testé 3	PCT3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F8	2	Prod. chim. testé 3	PCT3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	F9	3	Prod. chim. testé 3	U3	6	1.00E-04	30	50	10	10	100	1.0E-05
P1	G7	1	Prod. chim. testé 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G8	2	Prod. chim. testé 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	G9	3	Prod. chim. testé 3	U3	7	1.00E-03	30	50	10	10	100	1.0E-04
P1	H7	1	Prod. chim. testé 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H8	2	Prod. chim. testé 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	H9	3	Prod. chim. testé 3	U3	8	1.00E-02	30	50	10	10	100	1.0E-03
P1	A10	1	Témoin E2 (max)	S	E2max1	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A11	2	Témoin E2 (max)	S	E2max2	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	A12	3	Témoin E2 (max)	S	E2max3	1.00E-06	30	50	10	10	100	1.00E-07
P1	B10	1	Témoin E2 (CI <sub>50</sub> )	S	E2CI <sub>50</sub> 1	E2CI <sub>50</sub> x 10	30	50	10	10	100	E2CI <sub>50</sub>
P1	B11	2	Témoin E2 (CI <sub>50</sub> )	S	E2CI <sub>50</sub> 2	E2CI <sub>50</sub> x 10	30	50	10	10	100	E2CI <sub>50</sub>
P1	B12	3	Témoin E2 (CI <sub>50</sub> )	S	E2CI <sub>50</sub> 3	E2CI <sub>50</sub> x 10	30	50	10	10	100	E2CI <sub>50</sub>
P1	C10	1	Témoin NE (max)	S	NEmax1	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C11	2	Témoin NE (max)	S	NEmax2	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	C12	3	Témoin NE (max)	S	NEmax3	1.00E-3.5	30	50	10	10	100	1.00E-4.5
P1	D10	1	Témoin NE (CI <sub>50</sub> )	S	NECI <sub>50</sub> 1	NECI <sub>50</sub> x 1	30	50	10	10	100	NECI <sub>50</sub>
P1	D11	2	Témoin NE (CI <sub>50</sub> )	S	NECI <sub>50</sub> 2	NECI <sub>50</sub> x 1	30	50	10	10	100	NECI <sub>50</sub>
P1	D12	3	Témoin NE (CI <sub>50</sub> )	S	NECI <sub>50</sub> 3	NECI <sub>50</sub> x 1	30	50	10	10	100	NECI <sub>50</sub>

P1	E10	1	E2 froid (élevé)	LNS	S1	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E11	2	E2 froid (élevé)	LNS	S2	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	E12	3	E2 froid (élevé)	LNS	S3	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F10	4	E2 froid (élevé)	LNS	S4	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F11	5	E2 froid (élevé)	LNS	S5	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	F12	6	E2 froid (élevé)	LNS	S6	1.00E-05	30	50	10	10	100	1.0E-06
P1	G10	1	liaison totale	LT	LT1	-	30	60	10	-	100	-
P1	G11	2	liaison totale	LT	LT2	-	30	60	10	-	100	-
P1	G12	3	liaison totale	LT	LT3	-	30	60	10	-	100	-
P1	H10	4	liaison totale	LT	LT4	-	30	60	10	-	100	-
P1	H11	5	liaison totale	LT	LT5	-	30	60	10	-	100	-
P1	H12	6	liaison totale	LT	LT6	-	30	60	10	-	100	-

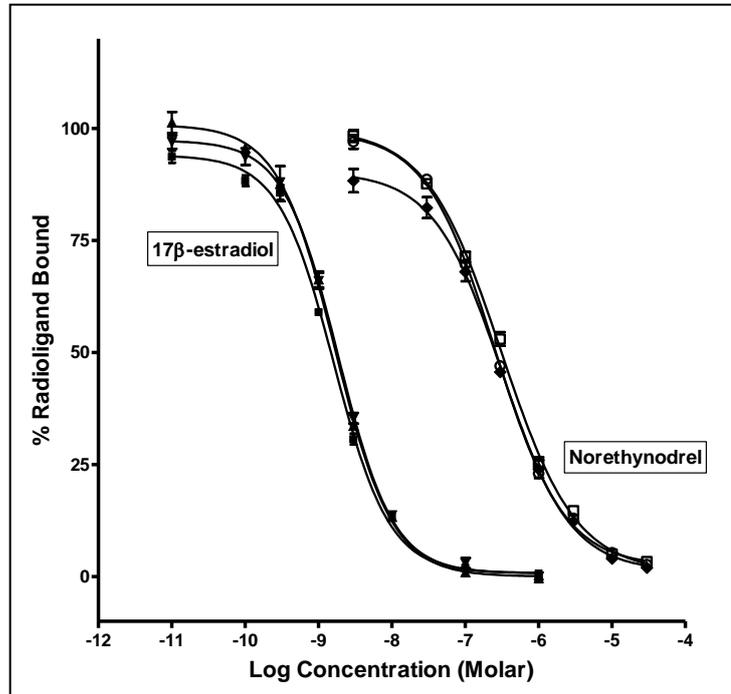
**ANNEXE 4****Observations relatives à l'analyse des données de l'essai de liaison compétitive au hrER**

1. L'essai de liaison compétitive au hrER $\alpha$  mesure la liaison d'une concentration fixe de [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol en présence de concentrations croissantes de produit chimique testé. La courbe de liaison compétitive présente la liaison spécifique du [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol en fonction de la concentration (en  $\log_{10}$ ) du compétiteur. La concentration de produit chimique testé qui inhibe 50 % de la liaison spécifique maximale du [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol correspond à la  $\text{CI}_{50}$ .

***Analyse des données obtenues pour la substance œstrogénique de référence et le ligand faible (1)***

2. Les données des essais sur les témoins sont transformées (en pourcentage de liaison spécifique du [ $^3\text{H}$ ]-17 $\beta$ -œstradiol et logarithme de la concentration de la substance témoin) pour les analyses ultérieures. Des estimations des  $\log(\text{CI}_{50})$  des témoins positifs (p.ex. substance œstrogénique de référence et ligand faible) sont obtenues grâce à un logiciel approprié d'ajustement de courbe par méthode non linéaire d'après une équation de Hill à quatre paramètres (p.ex. BioSoft ; GraphPad Prism) (2). Ces ajustements se font généralement sans imposer de limites au sommet, à la base, à la pente et au  $\log(\text{CI}_{50})$  des courbes. Le meilleur ajustement des courbes est établi grâce à une solide analyse de régression, une justification étant nécessaire dans le cas contraire. La méthode choisie pour cette solide analyse de régression sera indiquée. Les méthodes d'essai de liaison au hrER de FW et du CERI ne requièrent pas de correction relative à la perte de ligand, mais il est possible d'y avoir recours, s'il y a lieu. Après l'analyse initiale, chaque courbe de liaison est examinée pour vérifier qu'elle est bien ajustée au modèle. L'affinité de liaison relative (ALR) du ligand faible peut être exprimée en pourcentage à partir du rapport entre le  $\log(\text{CI}_{50})$  du ligand faible et le  $\log(\text{CI}_{50})$  du 17 $\beta$ -œstradiol. Les résultats obtenus pour les témoins positifs et négatifs doivent être évalués à l'aide des critères de performance de l'essai et d'acceptabilité décrits dans la LDAP (paragraphe 20), dans l'annexe 2 (essai de FW, paragraphes 41-51) et dans l'annexe 3 (essai du CERI, paragraphes 41-51). Des exemples illustrant trois essais sur la substance œstrogénique de référence et le ligand faible sont présentés dans le graphique 1.

Graphique 1. Exemples de courbes de liaison compétitive pour la substance œstrogénique de référence et le ligand faible témoin



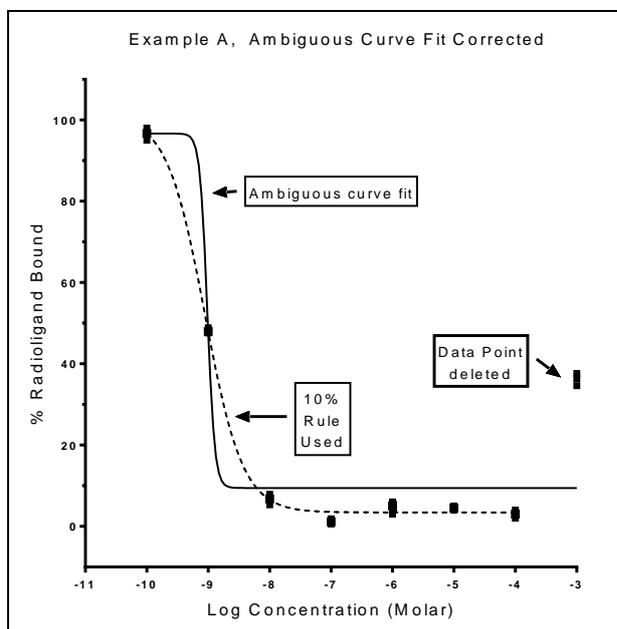
% Radioligand bound = % de ligand radiomarqué lié / Concentration (log Molar) = Concentration (logM) /  
 Norethynodrel = Noréthynodrel / 17β-estradiol = 17β-œstradiol

### *Analyse des données des produits chimiques testés*

3. Les données obtenues pour tous les produits chimiques testés doivent être analysées par étape pour veiller à l'évaluation appropriée des résultats et à la classification correcte de chaque courbe de liaison compétitive. Chaque essai sur un produit chimique testé donne d'abord lieu à une analyse des données normalisée identique à celle qui est utilisée pour la substance œstrogénique de référence et les témoins avec ligand de faible affinité. Cette étape est suivie d'un examen technique de l'ajustement des paramètres de la courbe et d'un examen visuel pour déterminer dans quelle mesure les données correspondent à la courbe de liaison compétitive obtenue pour chaque essai. Cet examen technique repose sur trois observations indiquant que l'essai et les analyses ont été réalisés correctement : une baisse du pourcentage de [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol lié aux sites spécifiques en fonction de la concentration, une faible variabilité entre les réplicats techniques de chaque concentration de produit chimique testé et la cohérence des paramètres d'ajustement entre les trois essais. On fera appel à un avis professionnel pour examiner les résultats de chaque essai d'un produit chimique testé, et les données utilisées pour classer un produit chimique testé comme ligand ou non-ligand doivent être défendables sur le plan scientifique.

4. Il peut arriver que certaines expériences exigent une attention supplémentaire pour analyser et interpréter convenablement les données de liaison au hrER. En effet, des études attestent que dans certains cas, l'analyse et l'interprétation des données de liaison compétitive au récepteur peuvent être compliquées par une remontée du pourcentage de liaison spécifique pour les concentrations d'essai les plus élevées (graphique 2). Ce problème bien connu est survenu pendant la mise en œuvre des protocoles dans plusieurs essais de liaison compétitive au récepteur (3). Dans ce genre de situation, la réponse dépend de la concentration à basse concentration, mais lorsque cette dernière approche de la limite de solubilité, le [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol cesse d'être remplacé par le produit chimique testé. Le cas échéant, les données obtenues pour les concentrations élevées indiquent que la limite biologique de l'essai est atteinte. Par exemple, ce phénomène est souvent associé à une insolubilité chimique et à une précipitation à forte concentration ; il peut aussi traduire un dépassement de la capacité du DCC à piéger le ligand radiomarqué libre pendant la procédure de séparation, pour les concentrations d'essai les plus élevées. Conserver ces points lors de l'ajustement des données de liaison compétitive à une courbe sigmoïde pourrait entraîner une mauvaise classification de l'affinité de liaison aux ER du produit chimique testé (graphique 2). Pour éviter cette situation, le protocole des essais de liaison au hrER de FW et du CERI permet d'exclure des points de données de l'analyse lorsque la moyenne du pourcentage de liaison spécifique du [<sup>3</sup>H]-17β-œstradiol pour tous les réplicats dépasse d'au moins 10 % la moyenne de la liaison observée à une concentration inférieure. Cette règle communément appelée « règle des 10 % » ne peut être appliquée qu'une seule fois par courbe, et l'analyse doit se faire à partir des données de six concentrations au minimum afin de classer la courbe correctement.

Graphique 2. Exemples de courbes de liaison compétitive avec ou sans application de la règle des 10 %



Example A, Ambiguous Curve Fit Corrected = Exemple A, correction d'un ajustement ambigu

% Radioligand bound = % de ligand radiomarqué lié

Log Concentration (Molar) = Concentration (logM)

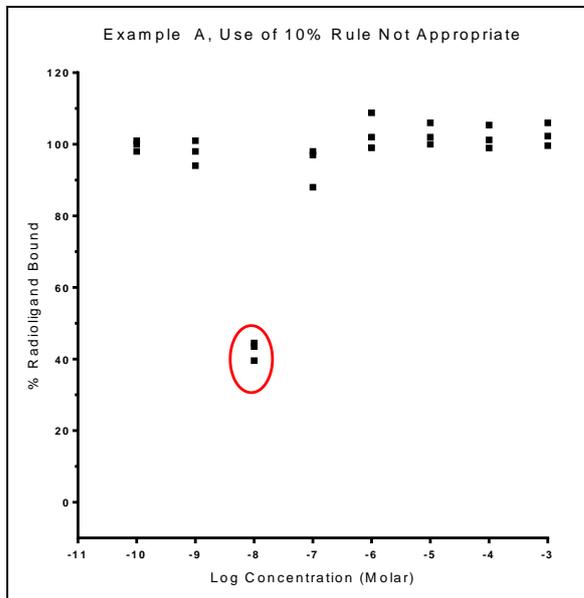
Ambiguous curve fit = Ajustement de la courbe ambigu

10% Rule Used = Application de la règle des 10 %

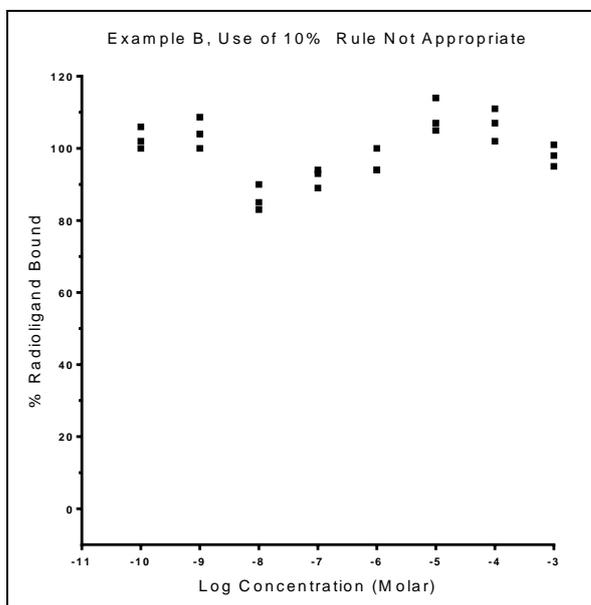
Data point deleted = Point éliminé

5. On examinera prudemment s'il convient d'appliquer la règle des 10 % pour corriger les courbes concernées, règle réservée aux substances chimiques qui ont de fortes chances d'être des ligands du hrER. Au fil des expériences de l'étude de validation de l'essai de liaison au hrER de FW, il a été relevé que la règle des 10 % pouvait avoir des conséquences involontaires et inattendues. En effet, des produits chimiques n'interagissant pas avec le récepteur (donc non-ligands) affichaient souvent une variabilité supérieure à 10 % sur toute la fourchette de concentrations d'essai quand la liaison du ligand radiomarqué était proche de 100 %. Si la liaison la plus basse correspondait à une faible concentration, l'application de la règle des 10 % pouvait entraîner l'élimination des données obtenues pour toutes les concentrations supérieures, bien qu'elles puissent servir à démontrer que le produit chimique testé est un non-ligand. Le graphique 3 présente des exemples dans lesquels il ne faut pas appliquer la règle des 10 %.

**Graphique 3. Exemples de courbes de liaison compétitive dans lesquelles il ne faut pas appliquer la règle des 10 %**



Example A, Use of 10% Rule Not Appropriate = Exemple A : la règle des 10 % ne doit pas être appliquée  
 % Radioligand bound = % de ligand radiomarqué lié  
 Log Concentration (Molar) = Concentration (logM)



Example B, Use of 10% Rule Not Appropriate = Exemple B : la règle des 10 % ne doit pas être appliquée  
 % Radioligand bound = % de ligand radiomarqué lié  
 Log Concentration (Molar) = Concentration (logM)

## BIBLIOGRAPHIE

1. OCDE (2015), Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER $\alpha$ ), Série sur les essais et évaluations n°226, OCDE, Paris.
2. Motulsky H. et Christopoulos A. (2003), The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression. GraphPad Software Inc., San Diego (Californie), p. 187-191. Disponible à l'adresse : [[www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf](http://www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf) ].
3. Laws S.C., Yavanxay S., Cooper R.L., Eldridge J.C. (2006), Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors. *Toxicological Sci.* 94(1) : p. 46-56.