

REFERENCE DE L'ETUDE	OEDT-24/0005
DATE DE L'ETUDE	03/04/2024 - 10/04/2024
DONNEUR D'ORDRE	GREEN FAMILY
ELEMENT D'ESSAI	Couches L&G
REFERENCE	F4

## 1. OBJECTIF DE L'ETUDE

Le test in vitro de détection de l'activité œstrogénique par la méthode OEDT permet une détection des perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique dans un produit par un test cellulaire. En cas d'activité œstrogénique avérée, un dosage exprimé en équivalent œstradiol est calculé selon le modèle d'étude.

## 2. ELEMENTS D'ESSAI

NOM	Couches L&G
REFERENCE	F4
LOT	SBD2 16:24 2023.10.22
PRESENTATION	Solide

### **3. PRINCIPE DE L'ETUDE**

L'étude est réalisée selon la norme ISO19040-1.

Le test in vitro de détection de l'activité œstrogénique par la méthode OEDT s'effectue sur des cellules vivantes (de type levures) génétiquement modifiées pour produire le récepteur aux œstrogènes (ER) à l'aide d'une détection spectrophotométrique. Ces cellules contiennent un gène rapporteur de l'activité œstrogénique codant pour l'enzyme β-galactosidase et dont l'expression est contrôlée par l'activation de ce récepteur en présence d'un perturbateur endocrinien.

En cas de liaison d'un perturbateur endocrinien de type œstrogénique avec le récepteur aux œstrogènes, celui-ci devient actif et le gène rapporteur est exprimé. Ce test permet donc d'évaluer le niveau et la nature du risque biologique associé.

La quantité de perturbateurs de type œstrogénique est déterminée par une mesure de l'activité de la β-galactosidase corrélée à la quantité du complexe récepteur-perturbateurs (ER-PE) formé.

Selon la récente classification<sup>1</sup> établie par le groupe de travail OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) au sujet des perturbateurs endocriniens, les tests *in vitro* de transactivation du récepteur aux œstrogènes (OECD TG 455) et de liaison entre le récepteur aux œstrogènes et les perturbateurs endocriniens sont classés comme tests de niveau 2.

Une récente publication<sup>2</sup> a montré la cohérence en terme de sensibilité vis-à-vis de la détection des PE entre des lignées cellulaires humaines, telles qu'utilisées dans le test OECD TG 455, et notre modèle de levures.

### **4. DEROULEMENT DE L'ETUDE**

#### **Modèle de l'étude : Test cellulaire**

Les mesures d'activation du récepteur aux œstrogènes humain recombinant exprimé chez *S. cerevisiae* (W303.1B) ont été reproduites en triplicate de manière indépendante pour chaque concentration testée. Pour chaque concentration, trois mesures sont effectuées.

En parallèle, la courbe d'activité œstrogénique en fonction de la concentration en œstradiol (E2) a été réalisée.

L'activité œstrogénique est montrée dans la figure 1 sous forme d'histogramme pour chaque dilution testée.

Les résultats en termes d'activité œstrogénique sont normalisés selon la formule suivante :

$$\text{Activité œstrogénique relative} = (A_{\text{échantillon}} - A_{\text{min}}) / (A_{\text{max}} - A_{\text{min}})$$

$$A_{\text{min}} = A_{\text{solvant}}$$

$$A_{\text{max}} = A_{\text{E2max}}$$

<sup>1</sup> OECD RECENT ACTIVITIES ON ENDOCRINE DISRUPTERS TESTING AND ASSESSMENT , Anne Gourmelon, Meeting- Human Health and Environmental Risks of Endocrine Active Substances, 2013.

<sup>2</sup> Hae Kyung Lee, et Al., The Journal of Toxicological Sciences, Vol 37, N°2, 431-437, 2012

Afin d'exprimer les valeurs d'activité œstrogénique en équivalent œstradiol (contenu dans le milieu de culture), on utilise la courbe de calibration d'activité œstrogénique en fonction de la concentration en œstradiol (E2) (figure 2). Si la valeur d'activité œstrogénique est trop faible, il est alors impossible de calculer un équivalent œstradiol. On en déduit que le produit ne présente pas d'activité œstrogénique selon le modèle d'étude utilisé.

Si au contraire l'activité œstrogénique permet de calculer un équivalent œstradiol, on calcule l'équivalent d'œstradiol circulant chez l'homme sur la base de notre modèle. Ce dernier intègre, un principe de précaution, une notion d'usage (en fonction du produit testé) et une notion de seuil et donc de risque potentiel.

### **Postulat de l'étude**

Le produit est absorbé en totalité et dilué dans le volume de sang circulant dans le corps (environ 5L). Les molécules présentes dans le produit ne sont pas métabolisées par l'Homme en d'autres molécules plus ou moins toxiques.

### **Notion de seuil – risque potentiel**

Les quantités d'œstradiol E2 circulant (exprimée en g/5L) naturellement chez « l'homme » sont exprimées ci-dessous :

- Chez la femme ménopausée/Chez l'homme :  $4.0 \times 10^{-11} - 2.0 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$
- Chez la femme non ménopausée (hors ovulation) :  $1.0 \times 10^{-10} - 6.0 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$
- Chez la femme (ovulation) :  $2.0 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$

Selon le modèle d'étude, une valeur est considérée comme critique lorsqu'elle est égale ou supérieure à la moitié du taux d'œstradiol moyen circulant chez la femme en ovulation, soit  $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ .

### **Protocole du test cellulaire**

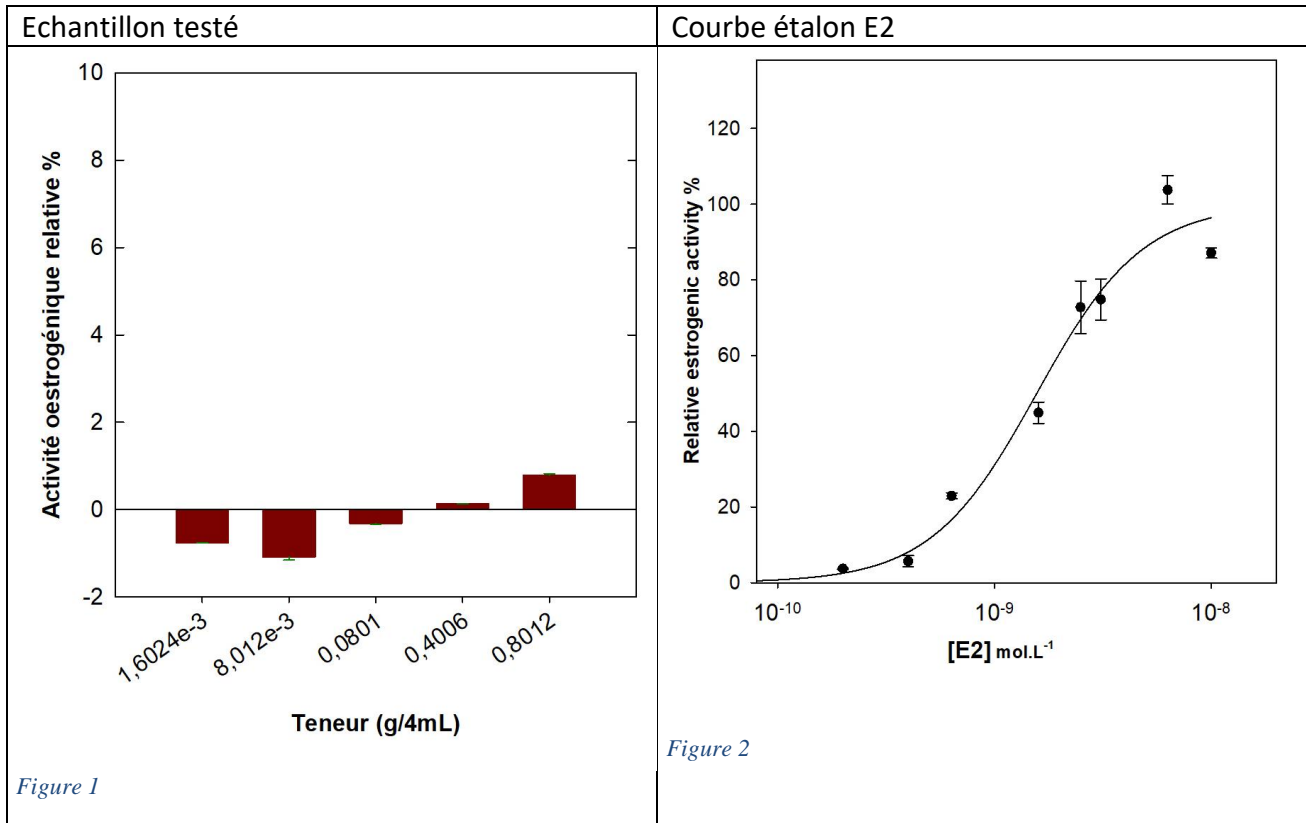
1. Préparation de la pré-culture dans un milieu sélectif : la pré-culture, préparée à partir d'un stock glycérolé de levures *S. cerevisiae* co-transformées, est incubée à 30°C sous agitation pendant 14h.
2. Préparation de la culture dans un milieu enrichi : 150mL de milieu de culture sont ajustés avec du milieu de pré-culture de sorte que l'absorbance mesurée à 600nm soit de 0,1. La culture est ensuite incubée à 30 °C sous agitation pendant 8h.
3. Induction de l'expression du récepteur aux œstrogènes : dès que l'absorbance à 600nm est de 0,4 - 0,6. L'expression du récepteur aux œstrogènes ( $\text{hER}\alpha$ ) est induite (révélée) par ajout de galactose dans le milieu de culture.
4. Préparation de l'échantillon à tester  
20.03g de produit ont été ajoutés à 400mL d'acétone, puis cette solution est incubée à 30°C sous agitation pendant 22h. L'échantillon est concentré par évaporation sous vide à 30°C. Le volume

recupéré après évaporation est de 1mL. L'échantillon obtenu est un liquide translucide jaune/vert. Les mesures ont été effectuées sur l'échantillon non dilué et dilué dans l'acétone (Figure 1).

5. Stimulation de la culture (4mL) par ajout de 40µL de solution d'œstradiol pur (E2) afin d'obtenir la courbe de référence (incubation à 30°C sous agitation pendant 6h). Figure 2.
6. Stimulation de la culture (4mL) par ajout de 40µL de l'échantillon à tester (incubation à 30°C sous agitation pendant 6h).
7. Mesure des activités transcriptionnelles.

## 5. RESULTATS

Les résultats des mesures d'activités pour évaluer le risque biologique associé à une activité œstrogénique sont présentés ci-dessous.



## 6. CONCLUSION

Dans les conditions expérimentales, le produit **Couches L&G** – référence **F4** – lot N° **SBD2 16:24 2023.10.22**, ne présente pas d'activité œstrogénique.

Véronique LE TILLY / BIOLOGISTE  
Le 14/04/2024,

