

*PROJET DE LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE***Détermination de la clairance intrinsèque in vitro sur des hépatocytes de truite arc en ciel (RT-HEP) cryoconservés****INTRODUCTION**

1. Afin d'améliorer les prédictions in silico de la bioaccumulation des produits chimiques chez le poisson, il est souhaitable de disposer de méthodes permettant d'estimer la biotransformation hépatique et d'intégrer cette information aux modèles de calcul établis. Une approche prometteuse consiste à mesurer la clairance intrinsèque sur des systèmes métabolisants in vitro dérivés de tissu hépatique (Nichols, Schultz et Fitzsimmons, 2006).
2. La présente Ligne directrice (LD) décrit l'utilisation d'hépatocytes de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* (RT-HEP) cryoconservés afin de déterminer la clairance intrinsèque in vitro (CL, IN VITRO, INT) du produit chimique testé, par une approche fondée sur la déplétion du substrat.
3. Le Document d'orientation de l'OCDE RT-HEP et RT-S9 (OCDE, 2018a) qui accompagne la présente Ligne directrice et la Ligne directrice RT-S9 (OCDE, 2018b) décrit comment appliquer ces méthodes de façon optimale et utiliser la CL, IN VITRO, INT pour renseigner les modèles in silico de prédiction de la bioaccumulation chez le poisson.
4. En résumé, la clairance hépatique intrinsèque est estimée à partir de la valeur obtenue pour la CL, IN VITRO, INT, et peut être utilisée directement comme donnée d'entrée des modèles toxicocinétiques physiologiques (PBTK, pour physiologically based toxicokinetic) d'évaluation de la bioaccumulation chez le poisson (Stadnicka-Michalak et al., 2014 ; Brinkmann et al., 2016). Une autre possibilité consiste à extrapoler cette valeur pour établir une constante de vitesse de biotransformation du corps entier (in vivo) en utilisant un modèle approprié d'extrapolation in vitro-in vivo (IVIVE). Un modèle IVIVE applicable à la truite arc-en-ciel a récemment été décrit par Nichols et al. (Nichols et al., 2013) et figure à titre d'exemple dans le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 (OCDE, 2018a).
5. La vitesse de biotransformation in vivo peut être incluse dans des modèles in silico de prédiction des facteurs de bioconcentration (BCF). Plusieurs équipes de

© OCDE (2018)

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu aux conditions décrites sur le site: <http://www.oecd.org/fr/conditionsdutilisation>.

Selon la Décision du Conseil de déléguer son autorité pour les amendements à l'Annexe I de la Décision du Conseil sur l'Acceptation Mutuelle des Données dans l'Évaluation des Produits Chimiques [C(2018)49], cette Ligne directrice a été approuvée par la Réunion Conjointe du Comité des Produits Chimiques et le Groupe de Travail sur les Produits Chimiques, les Pesticides et la Biotechnologie, par procédure écrite le 25 juin 2018.

recherche ont montré que l'intégration de données de biotransformation établies par des méthodes *in vitro* à des modèles à un compartiment applicables aux poissons améliore notablement les performances de ces modèles ; les niveaux d'accumulation prédits sont alors beaucoup plus proches des valeurs mesurées que les prédictions obtenues en ne tenant pas compte du métabolisme (Cowan-Ellsberry et al., 2008 ; Dyer et al., 2008, 2009 ; Han et al., 2007 ; Laue et al., 2014 ; Mingoia et al., 2010 ; Fay et al., 2014a, 2014b). D'autres considérations relatives à la prédiction des BCF figurent dans le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 (OCDE, 2018a).

6. La présente ligne directrice est fondée sur la méthode utilisée dans un essai circulaire récent, qui en a démontré la reproductibilité sur cinq produits chimiques et un produit de référence testés dans six laboratoires. Des précisions sur les produits chimiques testés et sur la variabilité inter- et intra-laboratoires des résultats figurent dans le rapport relatif à cet essai circulaire (OCDE, 2018c).

7. Le nombre de produits chimiques testés pour l'élaboration de la présente LD est, certes, limité. Toutefois, des CL, IN VITRO, INT ont été établies par des protocoles d'incubation comparables utilisant des hépatocytes, la fraction subcellulaire S9 du foie ou des microsomes de poisson pour une série de produits chimiques, et bon nombre de ces données ont été publiées dans des publications à comité de lecture (le tableau R.7.10-6 de l'annexe R.7.10-2 du document d'orientation de REACH comporte une liste de publications récentes (ECHA, 2017)). De plus, une base de données sur la biotransformation *in vitro* chez les poissons comprenant des données de clairance intrinsèque établies par des méthodes *in vitro* (hépatocytes, fraction S9, microsomes) a été établie. Cette base de données est publiquement disponible à partir du Centre commun de recherche CE CCR (Halder, Lostia and Kienzler, 2018), ce qui permettra aux utilisateurs de déterminer si leur(s) produit(s) chimique(s) entre(nt) dans le domaine d'applicabilité de la méthode d'essai.

8. La définition des termes utilisés dans le présent document figure à l'annexe 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

9. Une méthode analytique validée doit obligatoirement être utilisée pour quantifier le produit chimique testé (cf. § 22) (OECD, 2014).

10. Dans le cas où la CL, IN VITRO, INT obtenue est utilisée pour renseigner des modèles de bioaccumulation *in silico* sur la biotransformation, le produit chimique testé doit entrer dans le domaine d'applicabilité du modèle considéré.

11. La durée totale d'incubation ne doit pas dépasser 4 h, en raison de la perte de viabilité des RT-HEP. Cela limite l'usage du test pour les produits chimiques dont la métabolisation est très lente. La vitesse la plus basse d'activité *in vitro* qui puisse être quantifiée de façon fiable correspond à une constante de vitesse d'élimination (k_e) de premier ordre d'environ 0.05 h⁻¹ à 0.14 h⁻¹ (Nichols et al., 2013 ; Chen et al., 2016). Pour plus de précisions, voir le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 (OCDE, 2018a).

12. La température d'incubation doit être de $11 \pm 1^\circ\text{C}$ et, comme les vitesses de biotransformation sont sensibles à la température, la température lors de l'essai doit être maintenue précisément à la température d'acclimatation, à l'aide d'un bain-marie, d'un incubateur ou d'un mélangeur thermorégulé.

13. Pour les produits chimiques volatils et d'autres produits difficiles à tester, plusieurs méthodes alternatives sont proposées dans le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 (OCDE, 2018a), telles que l'utilisation de flacons d'incubation hermétiquement clos (flacons pour GC avec septum, par exemple) dans le cas des produits volatils, et l'utilisation de tubes à essai avec insert en verre ou le dosage passif pour les produits chimiques très peu solubles. Une configuration d'essai alternative est en outre présentée à l'annexe 7 (configuration d'essai 2).

14. Pour les produits chimiques ionisables, les constantes de dissociation (constantes d'acidité) correspondantes (valeurs pKa) doivent être connues avant l'essai, des changements de pH mineurs pouvant altérer l'équilibre entre les formes dissociées et non dissociées de certains produits. Le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 (OCDE, 2018a) présente des études récentes et des éléments d'information sur ce point.

15. Avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange, sur des produits chimiques et substances difficile à tester (parce qu'instable par exemple) ou sur des produits chimiques à la limite du domaine d'applicabilité de la Ligne directrice, il convient de considérer si les résultats générés par l'essai seront scientifiquement valables. On trouvera dans le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 des considérations sur l'application de la méthode à l'essai des mélanges (OCDE, 2018a).

16. La méthodologie décrite ici ne mesure que la déplétion d'un produit chimique parent. L'approche par la déplétion est également applicable à la détermination des métabolites – si des dispositions réglementaires l'exigent – voir à ce sujet le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 (OCDE, 2018a).

17. Des hépatocytes de poissons d'autres espèces que la truite arc-en-ciel peuvent être utilisés, à condition que des hépatocytes primaires puissent être isolés, et que les protocoles soient adaptés aux spécificités de chaque espèce (OCDE, 2018a).

FONDEMENT SCIENTIFIQUE DE LA MÉTHODE

18. La truite arc-en-ciel constitue une source d'hépatocytes relativement facile à utiliser, et il a été établi que les RT-HEP se prêtent bien à la cryoconservation, avec une perte minimale de capacité de métabolisation des xénobiotiques (Mingoia et al., 2010 ; Fay et al., 2014a). Il est donc possible de congeler les RT-HEP dans un laboratoire et de les distribuer à d'autres laboratoires en vue d'un usage ultérieur, et d'utiliser le même lot pour plusieurs essais séparés dans le temps.

19. Dans les hépatocytes de cultures primaires fraîches provenant de truites arc-en-ciel, le phénotype épithélial est préservé pour une large part ; le métabolisme des glucides et des lipides, en particulier, est fonctionnel (Segner et al., 1994 ; Polakof et al., 2011), tout comme les activités des enzymes de biotransformation de phase I (cytochrome P450 (CYP), notamment) et de phase II (sulfotransférases (SULT), uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransférases (UGT), glutathion-transférases (GST), notamment) (Segner et Cravedi, 2001). Leurs transporteurs membranaires sont fonctionnels, et ont été étudiés sur des substrats et des inhibiteurs connus (Bains et Kennedy, 2005 ; Hildebrand et al., 2009 ; Sturm et al., 2001 ; Žaja et al., 2008).

PRINCIPE DE L'ESSAI

20. La détermination de la CL, IN VITRO, INT d'un produit chimique testé est basée sur la déplétion du substrat. Le système d'incubation est constitué de RT-HEP (cf.

annexe 2) en suspension dans du milieu L-15 de Leibovitz (L-15) à une densité cellulaire de $1-2 \times 10^6$ cellules/mL. La réaction est déclenchée par l'addition du produit chimique testé à la suspension. Pour collecter des échantillons à différents points dans le temps, on arrête la réaction en transférant des aliquotes de la suspension dans une solution d'arrêt. La diminution de la concentration de produit chimique testé dans les échantillons provenant du flacon d'incubation est mesurée par une méthode analytique validée, et utilisée pour déterminer la CL, IN VITRO, INT. Des incubations utilisant des RT-HEP enzymatiquement inactifs sont réalisées comme témoin négatif permettant de faire la distinction entre la biotransformation enzymatique et la réduction abiotique.

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE TESTÉ

21. Avant la conduite de l'essai, il faut disposer des informations suivantes sur le produit chimique testé :

- Solubilité dans l'eau (LD 105 ; [OCDE, 1995a]) ;
- Solubilité dans le milieu de culture cellulaire ;
- Solubilité dans les solvants organiques (s'ils sont nécessaires pour la préparation du produit chimique testé) (OCDE, 2018a – Section 3.2) ;
- Coefficient de partage n-octanol/eau (log Kow) ou autres informations adaptées sur le comportement en matière de partage (LD 107, 117, 123 ; [OCDE, 1995b, 2004a, 2006a]) ;
- Stabilité du produit chimique testé dans l'eau (LD 111 ; [OCDE, 2004b]) et/ou le milieu d'essai ;
- Pression de vapeur (LD 104 ; [OCDE, 2006b]) ;
- Informations sur la dégradation biotique ou abiotique, biodégradabilité facile notamment (LD 301, 310 ; [OCDE, 1992, 2006c]) ;
- Constante d'acidité (pKa) pour les produits chimiques testés susceptibles de s'ioniser.

22. Il convient de disposer d'une méthode analytique validée, dont on connaît l'exactitude, la précision et la sensibilité, pour quantifier le produit chimique testé dans le mélange d'incubation, ainsi que d'instructions précises pour la préparation et le stockage des échantillons. La limite de quantification (Ldq) analytique du produit chimique testé dans le mélange d'incubation doit être connue.

PRODUIT CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE ET TEST DE COMPÉTENCE

23. Il est recommandé d'utiliser un produit chimique de référence approprié comme témoin positif pour vérifier les performances du système d'essai. Les points à prendre en compte dans le choix d'un produit chimique de référence approprié sont traités dans le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 – Section 4.2 (OCDE, 2018a).

24. Des produits chimiques de références peuvent également être utilisés pour mettre en place le système d'essai dans un laboratoire. Dans l'essai circulaire, le pyrène était utilisé comme produit chimique de référence (OCDE, 2018c).

VALIDITÉ DE L'ESSAI

25. Les critères de validité de l'essai sont les suivants :
- Les lots de RT-HEP doivent être évalués selon leur capacité à catalyser les réactions enzymatiques métaboliques de phases I et II, conformément aux indications de l'annexe 3 ;
 - Le rendement (en %) des RT-HEP cryoconservés (nombre de RT-HEP viables obtenus après décongélation rapporté au nombre de RT-HEP initialement cryoconservés) doit être ≥ 25 % ;
 - La viabilité des cellules dans la suspension de RT-HEP après décongélation (annexe 5) doit être ≥ 80 % ;
 - La densité de cellules dans la suspension finale de RT-HEP utilisée pour l'incubation doit être mesurée et se situer dans les limites de la densité nominale ($1.0 \pm 0.25 \times 10^6$ cellules / mL et $2.0 \pm 0.5 \times 10^6$ cellules / mL, respectivement) ;
 - Les témoins négatifs (RT-HEP enzymatiquement inactifs) ne doivent présenter aucune perte significative de produit chimique parent sur la durée de l'incubation (pertes < 20 % des pertes observées dans les incubations de RT-HEP actifs). De plus, les témoins négatifs ne doivent pas présenter d'augmentation sensible (> 20 %) du produit chimique parent sur la durée de l'incubation ;
 - Un minimum de six points dans le temps doit être utilisé pour déterminer la CL, IN VITRO, INT, c'est-à-dire établir l'équation de régression et calculer la pente, avec une valeur de $R^2 \geq 0.85$. Dans le cas des produits chimiques à métabolisation lente (donnant une pente très peu marquée, par exemple), R^2 peut être < 0.85 . Il convient alors d'évaluer dans quelle mesure la pente est significativement différente de zéro, avant d'inclure ou d'exclure l'épreuve ;
 - Un minimum de deux épreuves indépendantes doit être réalisé (cf. § 35). Si l'analyse de régression donne des résultats significativement différents à l'issue des deux épreuves avec RT-HEP actifs (test t des pentes pour $p < 0.05$, par exemple), une troisième épreuve doit être réalisée afin d'obtenir deux épreuves confirmatoires.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

26. Les équipements suivants sont nécessaires pour l'incubation des RT-HEP :
- Réfrigérateur à 4°C ;
 - Congélateur à -20°C ;
 - Réservoir de stockage dans l'azote liquide ou congélateur à ultrabasse température (-150°C) pour le stockage des RT-HEP cryoconservés ;
 - Balance analytique pour la mesure des réactifs et des produits chimiques testés ;
 - pH-mètre ;
 - Agitateur vortex ;

- Centrifugeuse réfrigérée pour tubes de 50 mL ;
- Tubes à centrifuger coniques de 50 mL ;
- Équipement pour l'incubation des échantillons, tel que bain-marie à agitation avec dispositif de refroidissement, incubateur à agitation avec fonctions de chauffage et de refroidissement, ou mélangeur thermorégulé avec fonctions d'agitation ;
- Verrerie pour la préparation des solutions, réactifs, etc. ;
- Flacons de verre pour test d'incubation (tubes à essai à scintillation de 7 mL, par exemple) ;
- Tubes de microcentrifugation de 1.5 mL ;
- Petite centrifugeuse de paillasse réfrigérée pour tubes de microcentrifugation ;
- Fioles à échantillons en verre pour HPLC/GC ou d'autres techniques d'analyse ;
- Pipettes et embouts ;
- Équipements et réactifs appropriés pour le comptage des RT-HEP.

Produits chimiques pour les mesures analytiques

27. Les produits chimiques suivants sont nécessaires :

- Solvant servant à dissoudre le produit chimique testé, qualité analytique ou équivalente (méthanol, acétonitrile, acétone, par exemple) ; le solvant doit être miscible au milieu aqueux utilisé dans la suspension de RT-HEP ;
- Solvants d'arrêt et d'extraction, qualité analytique ou équivalente (méthanol, acétonitrile, chlorure de méthylène, méthyl tert-butyl éther, par exemple).

RT-HEP cryoconservés

28. Les RT-HEP cryoconservés peuvent provenir d'éventuelles sources commerciales ou être préparés selon le protocole présenté à titre d'exemple à l'annexe 2.

29. La capacité de chaque lot de RT-HEP à catalyser les réactions de biotransformation de phases I et II doit être évaluée. Des tests standardisés de détermination de l'activité enzymatique de phases I et II sont présentés brièvement à l'annexe 3. Ces tests de caractérisation, ou des produits de référence connus, seront utilisés pour tester un nouveau lot de RT-HEP au début de l'étude ou avant la première utilisation du lot. Ils seront également utilisés ponctuellement pour suivre d'éventuelles pertes d'activité lors du stockage.

30. L'inclusion de RT-HEP enzymatiquement inactifs est obligatoire. Les incubations de RT-HEP inactifs servent de témoin négatif permettant de distinguer la biotransformation enzymatique d'autres processus de perte potentiels, tels que l'adsorption sur le flacon d'incubation, la volatilisation ou la dégradation abiotique (pour plus de précisions, voir le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 ; [OCDE, 2018a]). L'annexe 4 comporte un protocole d'inactivation enzymatique par chauffage. D'autres méthodes d'inactivation des RT-HEP peuvent être utilisées, mais n'ont pas été testées dans le cadre de l'essai circulaire (OCDE, 2018c).

Milieu de culture cellulaire et réactifs

31. Le milieu de culture cellulaire et les réactifs nécessaires pour la décongélation et l'incubation des RT-HEP sont indiqués à l'annexe 5.

Configuration de l'essai

32. Des essais préliminaires visant notamment à déterminer les plages de valeurs applicables (concentration de produit chimique testé, densité de cellules RT-HEP et durée d'incubation, par exemple) doivent être conduits afin d'établir les conditions d'incubation requises pour une mesure fiable de la clairance hépatique intrinsèque in vitro du produit chimique testé. L'annexe 6 précise comment déterminer les conditions donnant une cinétique de déplétion de premier ordre.

33. Un nombre suffisant de points d'échantillonnage dans le temps est nécessaire pour garantir la qualité de l'analyse de régression des concentrations logarithmiques du produit chimique. Un minimum de six points dans le temps sera utilisé pour générer cette régression.

34. Un exemple de configuration d'essai utilisant un seul flacon avec sept points dans le temps est présenté à la figure 1 de l'annexe 7. Cette configuration est recommandée pour l'essai des produits chimiques ne présentant pas de difficulté particulière (produits non volatils, n'adhérant pas aux parois des récipients et se distribuant rapidement dans le système d'incubation, par exemple) à une concentration d'essai. C'est la configuration qui procure généralement les résultats les moins variables, et la plus simple à réaliser. Pour les produits chimiques volatils ou très hydrophobes, l'utilisation de plusieurs flacons est recommandée (annexe 7 ; figure 2).

35. Chaque essai comporte au moins deux épreuves indépendantes de détermination de la CL, IN VITRO, INT. Les épreuves indépendantes se déroulent des jours distincts, ou le même jour à condition que pour chaque épreuve : a) les solutions du produit chimique testé (solutions-mères et solutions de travail fraîches) soient préparées indépendamment et b) les RT-HEP utilisés soient décongelés indépendamment ; toutefois, les RT-HEP peuvent provenir du même lot. Si l'analyse de régression donne des résultats significativement différents à l'issue des deux épreuves avec RT-HEP actifs (test t des pentes pour $p < 0.05$, par exemple), une troisième épreuve doit être réalisée afin d'obtenir deux épreuves confirmatoires.

36. Pour chaque épreuve, un flacon de RT-HEP actifs et un flacon de RT-HEP enzymatiquement inactifs est additionné du produit chimique testé, et un flacon de RT-HEP actifs est additionné d'un produit chimique de référence. Des échantillons sont collectés à chaque point dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90 et 120 min, par exemple). Dans certains cas, des flacons supplémentaires (duplicats pour chaque flacon, par exemple) peuvent être nécessaires pour s'assurer de l'exactitude de la méthode analytique pour le produit chimique testé.

37. Les paragraphes suivants décrivent la conduite de l'essai lorsqu'un seul flacon est utilisé ; la configuration à plusieurs flacons est décrite à l'annexe 7.

Préparation du produit chimique testé, des milieux et des solutions d'arrêt

38. Une ou plusieurs solutions-mères du produit chimique testé sont préparées dans un tampon de réaction (milieu L-15) ou dans un solvant adéquat préalablement testé. Les solvants classiques sont par exemple l'acétone, l'acétonitrile ou le méthanol. La stabilité

du produit chimique testé dans la solution-mère doit être évaluée préalablement à l'essai, si les solutions-mères ne sont pas fraîchement préparées (cf. Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 – Section 3.2 [OCDE, 2018a]).

39. Le jour de l'essai, la concentration souhaitée pour l'introduction du produit chimique testé dans les flacons est préparée par dilution de la solution-mère dans du tampon de réaction (milieu L-15) ou dans un solvant organique, selon les résultats des essais préliminaires (cf. § 32 ; annexe 6 ; OCDE, 2018a). Si un solvant organique est utilisé, la quantité totale de solvant dans la suspension d'incubation des RT-HEP doit être maintenue aussi faible que possible et ne doit pas dépasser 1 % afin d'éviter une inhibition de l'activité enzymatique. En règle générale, la concentration du produit chimique testé doit être environ 10 fois plus élevée que la Ld₅₀ de la méthode analytique, tant que cela se traduit par une cinétique de déplétion de premier ordre, d'après les résultats des essais préliminaires (cf. § 32 ; annexe 6).

40. Une solution d'arrêt (méthanol, acétonitrile, chlorure de méthylène, méthyl tert-butyl éther, par exemple) est préparée, en utilisant éventuellement un étalon interne. Pour la plupart des essais, des tubes de microcentrifugation de 1.5 mL peuvent être remplis à l'avance de solution d'arrêt (échantillon de 100 µL stoppé dans 400 µL de solution d'arrêt, par exemple) et stockés sur de la glace. Pour les solvants volatils (solvants s'évaporant à température ambiante, notamment, comme le chlorure de méthylène, le méthyl tert-butyl éther), les tubes doivent être maintenus fermés et conservés au froid, ou les solvants doivent être ajoutés juste avant la collecte, à chaque point dans le temps. Dans le cas de solvants qui interagissent avec les matières plastiques, des tubes en verre doivent être utilisés pour stopper la réaction (cf. Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 – Section 3.3 [OCDE, 2018a]).

Préparation de la suspension de RT-HEP

41. Le volume de suspension de RT-HEP (actifs ou enzymatiquement inactifs) nécessaire dans chaque flacon d'incubation dépend du nombre de points dans le temps souhaité, ainsi que du volume prélevé à chaque point dans le temps. Pour un mélange satisfaisant au dernier point dans le temps, le volume de suspension d'incubation des RT-HEP restant dans le flacon doit être suffisant pour couvrir le fond du flacon.

42. Dans la configuration à un seul flacon (figure 1, annexe 7), deux flacons de suspension de RT-HEP actifs et un flacon de suspension de RT-HEP enzymatiquement inactifs sont utilisés pour chaque épreuve. Lors de la préparation des deux suspensions, un excédent de 25 % est recommandé pour disposer d'un léger excès de matériel biologique, compte tenu du nombre de points dans le temps prévus dans la configuration d'essai. Ainsi, si 1.0 mL de suspension par flacon doit être utilisé lors de l'essai, on préparera environ 2.5 mL (2.0 mL + 25 %) de suspension de RT-HEP actifs et 1.25 mL (1.0 + 25 %) de suspension de RT-HEP enzymatiquement inactifs.

43. Pour les incubations, on utilise 1-2 x 10⁶ hépatocytes viables/mL. Les RT-HEP sont comptés par une méthode de base, telle que décrite in Fay et al., 2015. Après décongélation (annexe 5), le nombre de cellules viables est déterminé et ajusté à la densité cellulaire souhaitée, dans du milieu L-15 de pH 7.8. Pour des estimations très précises de la densité de RT-HEP, il est possible de procéder à de nouveaux comptages des cellules dans la suspension de RT-HEP, après dilution à la concentration d'incubation. Il est alors recommandé de procéder à trois nouveaux comptages post-dilution (au bleu de trypan, en utilisant des dilutions distinctes) sur la suspension d'incubation. Cette seconde série de comptages peut être réalisée pendant ou après

l'incubation, selon le temps disponible. Si, sur les trois comptages cellulaires, le coefficient de variation CV dépasse 20 %, un comptage supplémentaire peut être nécessaire pour une estimation exacte de la densité de cellules RT-HEP actives.

44. Le volume souhaité (1 mL, par exemple, pour sept points dans le temps) de suspension de RT-HEP actifs et enzymatiquement inactifs est ajouté à chacun des flacons d'incubation. Les flacons sont fermés (sans serrer le bouchon) puis pré-incubés à la température d'essai ($11 \pm 1^\circ\text{C}$) pendant 10 min sous agitation douce. Les RT-HEP ne doivent pas être agités vigoureusement ou vortexés.

Incubation avec le produit chimique testé et arrêt de la réaction

45. Le produit chimique testé (5 μL , en règle générale, mais cela dépend de la concentration de la solution d'ajout) est ajouté directement à la suspension de chaque flacon d'incubation (1 mL généralement) pour déclencher la réaction. Faire tourner les flacons pour répartir le produit chimique, et les fermer sans serrer le bouchon. Pendant toute l'incubation, les RT-HEP seront agités doucement (cf. § 44 ci-dessus) à la température d'essai ($11 \pm 1^\circ\text{C}$).

46. Pour l'échantillonnage à un point donné dans le temps, retirer le flacon d'incubation du bain-marie ou de l'incubateur, le faire tourner ou l'agiter délicatement afin de former une suspension homogène, prélever avec une pipette une aliquote (100 μL , par exemple) et l'introduire directement dans le tube de microcentrifugation de 1.5 mL correspondant contenant la solution d'arrêt glacée, conservée sur de la glace (cf. § 40). Pour garantir le transfert quantitatif de l'échantillon, il est recommandé de remplir et vider trois fois la pipette dans le solvant.

47. Les tubes de microcentrifugation sont conservés sur de la glace jusqu'à ce que les échantillons prélevés à tous les points dans le temps aient été collectés. Il peut être utile de réfrigérer les échantillons pendant une nuit pour faciliter la précipitation complète des protéines avant la centrifugation, si un solvant miscible à l'eau est utilisé comme solution d'arrêt. Si des solvants volatils comme le chlorure de méthylène ou le méthyl tert-butyl éther sont utilisés, les échantillons doivent être extraits si possible immédiatement après l'arrêt de la réaction. Des essais préliminaires seront réalisés pour confirmer la précipitation complète des protéines dès l'interruption de la réaction (annexe 6).

48. Une fois tous les échantillons prélevés ou, dans le cas des solvants volatils, à chaque échantillonnage, les tubes de microcentrifugation sont vortexés (pendant 3 min à 1 500 2 000 tr/min, par exemple) et centrifugés (15 min à 20 000 x g et 4°C , par exemple). Pour certains produits chimiques d'essai, une nuit de réfrigération peut être nécessaire pour obtenir une extraction maximale par le solvant. Pour plus de précisions, consulter le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 – Section 3.3 (OCDE, 2018a). Le surnageant est transféré dans des fioles à échantillons pour HPLC/GC et stocké à $-20 \pm 1^\circ\text{C}$ jusqu'à l'analyse.

MESURES ANALYTIQUES

49. La concentration du produit chimique testé est déterminée dans les échantillons par une méthode analytique validée. Pour plus de précisions, consulter le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 – Section 3.1 (OCDE, 2018a).

50. Toute la procédure reposant essentiellement sur l'exactitude, la précision et la sensibilité de la méthode analytique utilisée pour le produit chimique testé, il convient de

vérifier expérimentalement l'exactitude, la précision et la reproductibilité, ainsi que le taux de récupération (80-120 %) du produit chimique testé dans le mélange d'incubation.

DÉTERMINATION DE LA CLAIRANCE INTRINSÈQUE IN VITRO

51. Le graphique des logarithmes décimaux des concentrations de substrat en fonction du temps est tracé ; il doit faire apparaître une décroissance log-linéaire (valeur de $R^2 \geq 0.85$).

52. Si des points manifestement aberrants sont observés sur le tracé de la régression, on pourra appliquer un test statistique permettant de valider l'élimination des données parasites (comme indiqué par exemple dans [OCDE, 2006d]) et on justifiera dûment leur omission. Dans certains cas, un comportement non linéaire peut être observé au début ou à la fin d'un essai, ce qui peut être dû à des problèmes de dissolution du produit chimique testé ou de perte/d'inhibition de l'activité enzymatique. Toutefois, la vitesse de déplétion doit être déterminée d'après la partie linéaire de la courbe, sur un minimum de six points de données.

53. Si, au niveau des échantillons de RT-HEP enzymatiquement inactifs, on observe une perte abiotique du produit chimique testé qui ne peut pas être évitée par une optimisation des conditions d'essai (réduction abiotique $> 20\%$), le taux correspondant à ce processus de perte peut être soustrait du taux de déplétion mesuré dans les échantillons actifs, afin d'obtenir une clairance intrinsèque in vitro corrigée (Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 § 52 ; [OCDE, 2018a]). Dans ce cas, toutefois, il convient de vérifier que le processus de perte abiotique suit une cinétique de premier ordre.

54. Une constante de vitesse d'élimination de premier ordre, k_e (h^{-1}), est établie : elle est égale à $-2.3 \times$ pente de la décroissance log-linéaire.

55. En divisant k_e par la concentration de RT-HEP viables mesurée (déterminée par exemple par le test d'exclusion au bleu de trypan), on obtient la vitesse de clairance CL, IN VITRO, INT (mL/h/106 cellules). Si les RT-HEP ont été comptés avant et après dilution de la suspension de RT-HEP, on utilisera les comptages post-dilution.

RAPPORT D'ESSAI

56. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Produit chimique testé

- Substance mono-constituant :
 - apparence physique, solubilité dans l'eau et autres propriétés physico-chimiques pertinentes ; identification chimique telle que désignation IUPAC ou CAS, numéro CAS, code eSMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si cela est faisable en pratique, etc.
- Substance multi-constituants, substance de composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou matériels biologiques (UVCB) et mélanges :
 - caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

- Méthode analytique de dosage du produit chimique testé

RT-HEP

- En cas d'achat :
 - Source commerciale
 - Fournisseur de truites arc-en-ciel
 - Souche des truites arc-en-ciel
 - Température d'acclimatation
 - Poids des poissons
 - Poids des foies
 - Indice gonado-somatique (pour la détermination de la maturité sexuelle)
- En cas de préparation en interne, cf. tableau 3 : Modèle de rapport, à l'annexe 2
- Caractérisation (cf. annexe 3)
- Rendement (en %) après décongélation
- Viabilité des RT-HEP dans la suspension

Conditions d'essai

- Concentration du produit chimique testé et du produit chimique de référence
- Méthode de préparation des solutions-mères de produit chimique testé et de produit chimique de référence (nom et concentration du solvant, s'il y a lieu)
- Caractéristiques du milieu de culture cellulaire (température, pH)
- Température d'incubation
- Densité de cellules RT-HEP dans la suspension pour incubations (nominale et mesurée)
- Configuration d'essai (utilisation d'un seul flacon ou de plusieurs flacons)
- Nombre de réplicats (en cas d'utilisation de plusieurs réplicats par épreuve)
- Nombre d'épreuves indépendantes
- Points dans le temps
- Description des essais préliminaires

Méthode analytique

- Description complète de toutes les procédures d'analyse du produit chimique testé, incluant les limites de détection et de quantification, la variabilité et le taux de récupération, les matrices utilisées pour les préparations standard, les étalons internes, etc.

Méthode statistique

- Description et méthode statistique utilisée pour l'exclusion de points dans le temps et/ou d'épreuves

Résultats

- Résultats de tous les essais préliminaires effectués.
- Données relatives à chaque flacon et point dans le temps pour chaque épreuve indépendante (notamment : produit chimique testé, produit chimique de référence, RT-HEP actifs et enzymatiquement inactifs).
- S'ils sont mesurés, présence de métabolites formés (y compris, à titre facultatif : identification des métabolites et voies métaboliques).
- CL, IN VITRO, INT calculée pour chaque incubation indépendante avec RT-HEP actifs et enzymatiquement inactifs (produit chimique testé et produit chimique de référence, s'il y a lieu).
- Moyennes et écarts types des épreuves indépendantes non significativement différentes, et résultats des tests t de comparaison des CL, IN VITRO, INT moyennes des différentes épreuves.
- Points dans le temps ou épreuves exclus.
- Toute anomalie observée au cours de l'essai, tout écart par rapport à la Ligne directrice et toute autre information pertinente.

References

- Bains, O.S. and Kennedy, C.J. (2005), Alterations in respiration rate of isolated rainbow trout hepatocytes exposed to the P-glycoprotein substrate rhodamine 123, *Toxicology* 214:87-98.
- Brinkmann, M. et al. (2016), Cross-species extrapolation of uptake and disposition of neutral organic chemicals in fish using a multispecies physiologically-based toxicokinetic model framework, *Environmental Science & Technology* 50: 1914-23.
- Chen, Y. et al. (2016), Which molecular features affect the intrinsic hepatic clearance rate of ionizable organic chemicals in fish?, *Environmental Science & Technology* 50: 12722-12731.
- Cowan-Ellsberry, C.E et al. (2008), Approach for extrapolating in vitro metabolism data to refine bioconcentration factor estimates, *Chemosphere* 70:1804-1817.
- Dyer et al. (2008), In vitro biotransformation of surfactants in fish. Part I: Linear alkylbenzene sulfonate (C12-LAS) and alcohol ethoxylate (C13EO8), *Chemosphere* 72:850-862.
- Dyer et al. (2009), In vitro biotransformation of surfactants in fish. Part II: Alcohol ethoxylate (C13EO8) and alcohol ethoxylate sulfate (C14EO2S) to estimate bioconcentration potential, *Chemosphere* 76:989-998.
- ECHA (2017), Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment, Chapter R.7c: Endpoint specific guidance, Version 3.0.
- Fay, K.A et al. (2014a), Optimizing the use of rainbow trout hepatocytes for bioaccumulation assessments with fish, *Xenobiotica* 44:345-351.

- Fay, K.A., et al. (2014b), Intra- and interlaboratory reliability of a cryopreserved trout hepatocyte assay for the prediction of chemical bioaccumulation potential, *Environmental Science & Technology* 48:8170-8178.
- Fay, K.A., et al. (2015), Determination of metabolic stability using cryopreserved hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Current Protocols in Toxicology* 65:4.42.1-29.
- Halder, M., Lostia, A., Kienzler, A. (2018), EURL ECVAM Fish In Vitro Intrinsic Clearance Database, European Commission, Joint Research Centre (JRC) [Dataset] PID: <http://data.europa.eu/89h/jrc-eurl-ecvam-fish-in-vitro-intr-clear-db>.
- Han, X. et al. (2007), Determination of xenobiotic intrinsic clearance in freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat and its application in bioaccumulation assessment, *Environmental Science & Technology* 41:3269-3276.
- Hildebrand, J. et al. (2009), Functional and energetic characterization of P-gp-mediated doxorubicin transport in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 149:65-72.
- Laue, H. et al. (2014), Predicting the bioconcentration of fragrance ingredients by rainbow trout using measured rates of in vitro intrinsic clearance, *Environmental Science & Technology* 48:9486-9495.
- Mingoia, R.T. et al. (2010), cryopreserved hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A validation study to support their application in bioaccumulation assessment, *Environmental Science & Technology* 44:3052-3058.
- Nichols, J.W. et al. (2013), Towards improved models for predicting bioconcentration of well-metabolized compounds by rainbow trout using measured rates of in vitro intrinsic clearance, *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 1611-1622.
- Nichols, J.W., Schultz, I.R., and Fitzsimmons, P.N. (2006), In vitro-in vivo extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish: I. A review of methods, and strategies for incorporating intrinsic clearance estimates into chemical kinetic models, *Aquatic Toxicology* 78:74-90.
- OECD (1992), Test No. 301: Ready Biodegradability, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070349-en>.
- OECD (1995a), Test No. 105: Water Solubility, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069589-en>.
- OECD (1995b), Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069626-en>.
- OECD (2004a), Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069824-en>.
- OECD (2004b), Test No. 111: Hydrolysis as a Function of pH, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069701-en>.
- OECD (2006a), Test No. 123: Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264015845-en>.
- OECD (2006b), Test No. 104: Vapour Pressure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069565-en>.

- OECD (2006c), Test No. 310: Ready Biodegradability - CO₂ in sealed vessels (Headspace Test), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264016316-en>.
- OECD (2006d), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD Publishing, Paris, <http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono%282006%2918>.
- OECD(2014), Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Methods – Guidance used in Support of Pre-and-Post-Registration Data Requirements for Plant Protection and Biocidal Products, Series on Testing and Assessment No 204. ENV Publications, OECD, Paris, [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2014\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2014)20&doclanguage=en).
- OECD(2018a), Guidance Document on the Determination of in vitro intrinsic clearance using cryopreserved hepatocytes (RT-HEP) or liver S9 sub-cellular fractions (RT-S9) from rainbow trout and extrapolation to in vivo intrinsic clearance, Series on Testing and Assessment No. 280, OECD Publishing, Paris.
- OECD(2018b), Test Guideline No.319B: Determination of in vitro intrinsic clearance using rainbow trout liver S9 sub-cellular fraction (RT-S9), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris.
- OECD(2018c), Multi-laboratory ring trial to support development of OECD test guidelines on determination of in vitro intrinsic clearance using cryopreserved rainbow trout hepatocytes and liver S9 sub-cellular fractions, Series on Testing and Assessment No. 281, OECD Publishing, Paris.
- Polakof, S. et al. (2011), The metabolic consequences of hepatic AMP-kinase phosphorylation in rainbow trout, *PLoS one* 6:e20228.
- Segner, H. and Cravedi, J.P. (2001), Metabolic activity in primary cultures of fish hepatocytes, *Alternatives to Laboratory Animals* 29:251-257.
- Segner, H. et al. (1994), Cultured trout liver cells: utilization of substrates and response to hormones, *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 30:306-311.
- Stadnicka-Michalak, J. et al. (2014), Measured and modeled toxicokinetics in cultured fish cells and application to in vitro-in vivo toxicity extrapolation, *PLoS One*. 9, e92303.
- Sturm, A. et al. (2001), Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured hepatocytes from *Oncorhynchus mykiss*, *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281:R1119-R1126.
- Žaja, R. et al. (2008), Cloning and molecular characterization of apical efflux transporters (ABCB1, ABCB11 and ABCC2) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes, *Aquatic Toxicology* 90:322-332.

ANNEXE 1

Abréviations & définitions

ASB	Albumine sérique bovine
BCF	Facteur de bioconcentration (L/kg)
Cinétique de déplétion de premier ordre	Réaction chimique dans laquelle la vitesse de décroissance du nombre de molécules d'un substrat est proportionnelle à la concentration de molécules de substrat restantes
CL, IN VITRO, INT	Clairance intrinsèque in vitro (mL/h/106 cellules ou mL/h/mg de protéines)
CV	Coefficient de variation
CYP	Cytochrome P450
DMEM	Milieu Eagle modifié de Dulbecco
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Acide éthylènediamine tétraacétique
EROD	Éthoxyrésorufine-O-dééthylase
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GSH	L-Glutathion
GST	Glutathion transférase
HBSS	Solution saline équilibrée de Hank
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IGS	Indice gonado-somatique
ke	Constante de vitesse d'élimination (h-1)
KM	Constante de Michaelis-Menten
Kow	Coefficient de partage n-octanol/eau
L-15	Milieu L-15 de Leibovitz
LD	Ligne directrice
Ldq	Limite de quantification
Modèle IVIVE	Modèle d'extrapolation in vitro - in vivo
MS-222	Méthanesulfonate de tricaine
pKa	Constante de dissociation d'un acide ou Constante d'acidité
RT-HEP	Hépatocytes de truite arc-en-ciel cryoconservés
SFB	Sérum fœtal bovin
SULT	Sulfotransférase
tr/min	Tours par minute
UGT	Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransférase
Vmax	Vitesse maximale de la réaction enzymatique à concentration saturante de produit chimique testé

ANNEXE 2

Exemple de protocole pour l'isolement et la cryoconservation des hépatocytes de truite arc-en-ciel (RT-HEP)

NOTA : Les RT-HEP cryoconservés peuvent provenir d'éventuelles sources commerciales ou être préparés selon le protocole présenté à titre d'exemple dans la présente annexe. Ce protocole est adapté d'un protocole publié (Fay et al., 2015) et a été utilisé lors de l'essai circulaire (cf. Rapport de l'essai circulaire [OCDE, 2018]).

Poissons

1. Les RT-HEP doivent provenir de truites arc-en-ciel sexuellement immatures, une étude antérieure ayant montré que chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) sexuellement immature, les capacités métaboliques ne présentent pas de différences liées au sexe (Johanning et al., 2010, 2012 ; Fay et al., 2014). Les RT-HEP peuvent donc être recueillis sans tenir compte du sexe.
2. Si les poissons proviennent d'un fournisseur, ils doivent être acclimatés au laboratoire pendant deux semaines au moins avant utilisation. Les poissons ne doivent pas recevoir de traitement contre une maladie durant la période d'acclimatation de deux semaines et, dans la mesure du possible, le fournisseur doit avoir complètement évité de leur en administrer un. Les poissons présentant des signes cliniques de maladies ne doivent pas être utilisés.
3. Les truites arc-en-ciel sont généralement élevées à 10-15 °C. La température de l'aquarium utilisé au laboratoire doit être similaire, et maintenue à ± 2 °C. La densité de poissons doit être suffisamment basse pour assurer des conditions optimales de développement et de bien-être.
4. Les caractéristiques chimiques de l'eau doivent être mesurées et consignées à intervalles réguliers, en particulier le pH, l'alcalinité totale (en mg/L de CaCO_3), l'oxygène dissous (mg/L, converti en pourcentage de saturation) et l'ammoniac total (mg/L) (Tableau 3).
5. On consignera également des données précises sur le maintien des poissons, et notamment : photopériode, régime alimentaire, type d'aliments, température de l'eau, densité d'animaux (kg de poissons/litre dans l'aquarium) et nombre de poissons/aquarium (Tableau 3). Ces informations spécifiques doivent être consignées afin de permettre l'utilisation de paramètres relatifs à l'isolement dans des applications ultérieures telles que les modèles de prédiction des BCF.

Résumé de la procédure

6. La procédure d'isolement des hépatocytes de truite arc-en-ciel suit pour une large part les techniques d'obtention d'hépatocytes de mammifères (Fay et al., 2015, 2014 ; Mommsen et al., 1994 ; Mudra et Parkinson, 2001 ; Seglen, 1976 ; Segner, 1998).
7. Les poissons sont anesthésiés (mais vivants) lors de la procédure d'isolement, ce qui présente l'avantage que le système vasculaire hépatique est dilaté ; l'efficacité de la perfusion s'en trouve accrue. Canuler la veine porte hépatique et perfuser le foie avec une solution tampon saline équilibrée sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (tampon I ; cf. tableau 1) afin de débarrasser le foie du sang et des desmosomes détachés. Le foie est alors perfusé avec une solution saline équilibrée (avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) contenant une enzyme, la collagénase

(tampon II ; cf. tableau 1). Après digestion, la réaction avec la collagénase est stoppée par perfusion avec du milieu cellulaire contenant de l'albumine sérique bovine (tampon III ; cf. tableau 1) et les hépatocytes sont séparés mécaniquement de la capsule du foie.

8. Les hépatocytes primaires sont lavés et purifiés par gradient de densité. Tous les tampons sont ajustés au pH du sang des poissons et refroidis à la température d'acclimatation. Chez la truite arc-en-ciel, le pH est classiquement de 7.8 et la température de 11 ± 1 °C.

9. D'une façon générale, il est recommandé de réunir dans un même lot les hépatocytes de plusieurs poissons (trois à six). Cette approche permet de limiter l'influence des caractéristiques individuelles et d'obtenir une meilleure représentation d'une population. Le temps écoulé entre l'isolement et l'utilisation (ou la cryoconservation) des hépatocytes doit être aussi réduit que possible. Pour isoler rapidement les hépatocytes de plusieurs poissons, il est possible de procéder à l'isolement à plusieurs postes simultanément, ou de partager la ligne de perfusion entre plusieurs poissons. C'est ce dernier scénario qui est décrit ci-après.

Appareillage et matériel

10. Appareillage

- Cuves d'exposition des poissons à l'anesthésique.
- Balance numérique (1 g – 2000 g), nacelles de pesée.
- Centrifugeuse réfrigérée (pour tubes de 50 mL, par exemple).
- Tubes à centrifuger coniques (50 mL, par exemple).
- Pince à dissection, petits et grands ciseaux chirurgicaux tranchants.
- Tamis cellulaire (100 µm, par exemple).
- Bécher en verre de forme haute, 150 mL.
- Set de perfusion 21-G \times $\frac{3}{4}$ à ailettes de sécurité (cathéter papillon).
- Micro-pinces bulldog (facultatif ; Harvard Apparatus, NP 52-3258).
- Appareillage de perfusion (figure 3) comprenant :
 - bain-marie à circulation permettant de réguler la température à 11 ± 1 °C
 - pompe péristaltique
 - tubage pour pompe
 - condenseur à serpentín en verre à chemise d'eau (45 mm \times 260 mm ou similaire)
 - barboteur en verre à chemise d'eau, avec robinet d'arrêt
 - plateforme chirurgicale avec bac de rétention pour le sang et le perfusé (facultatif ; un plateau recouvert de papier absorbant suffit)
- Pipettes sérologiques et aide au pipetage
- Seaux de glace
- Conteneur cryogénique pour le stockage des cellules

- Azote liquide
 - Équipement de comptage des cellules
11. Tampons, milieux de culture cellulaire, produits chimiques
- Méthanesulfonate de tricaïne (MS-222).
 - Bicarbonate de sodium (NaHCO₃).
 - Éthanol, 70% (v/v).
 - Percoll.
 - Acide chlorhydrique (HCl), 1 N.
 - Milieu de Leibovitz L-15 (L-15).
 - Solution saline équilibrée de Hank (HBSS)
 - Sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA).
 - Albumine sérique bovine (ASB).
 - Sérum fœtal bovin (SFB).
 - Diméthylsulfoxyde (DMSO).
 - Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM).
 - Solution saline de Dulbecco tamponnée au phosphate (DPBS).
 - Collagénase (type IV).

Préparation des réactifs et des solutions

12. Le méthanesulfonate de tricaïne (MS-222 ; 150 mg/L) doit être préparé avec de l'eau provenant de la même source que l'eau utilisée pour maintenir les poissons préparés. Pour 8 L, par exemple, 1,2 g de MS-222 est ajouté à l'eau et mélangé jusqu'à dissolution. Une quantité prédéterminée de NaHCO₃ est utilisée pour maintenir le pH de l'eau de source. Si l'eau est faiblement alcaline, la masse de NaHCO₃ requise correspond à environ 3 fois la masse de MS-222.

13. Les trois tampons de perfusion sont préparés selon le tableau 1. Les quantités indiquées sont suffisantes pour perfuser trois ou quatre poissons.

Tableau 1 : Tampons de perfusion I, II et III

	Réactif	Pour 600 mL de préparation	Concentration
Tampon I pH 7.8	1 × HBSS (sans sels de Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	600 mL	
	EDTA	510 mg	2.3 mM
	NaHCO ₃	212 mg	4.2 mM
Tampon II pH 7.8	1 × HBSS (avec sels de Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	600 mL	
	Collagénase, type IV	150 mg**	0.25 mg/mL**
	NaHCO ₃	212 mg	4.2 mM
Tampon III pH 7.8	DMEM	600 mL	
	BSA	6.0 g	1% (m/v)

** Tampon II : L'activité de la collagénase varie d'un lot à l'autre, et la préparation ne contient pas une seule enzyme, mais également des protéases, polysaccharidases et lipases. Il peut être nécessaire d'ajuster la quantité utilisée selon la digestion du foie.

14. La solution de Percoll à 90 % pour la purification des cellules doit être préparée dans une enceinte biologique et par une technique stérile. La température du Percoll doit être conforme aux conditions d'essai (température à laquelle les poisons sont acclimatés). Verser 90 mL de Percoll refroidi dans un cylindre gradué et ajuster le volume à 100 mL avec de la solution DPBS × 10. Bien mélanger et ajuster le pH de la solution à 7.8 en ajoutant lentement du HCl 1 N. Si le pH descend en-dessous de 7.8, ne pas ajouter de NaOH, qui provoquerait la formation d'un précipité rendant la solution trouble, mais faire remonter le pH par addition de Percoll/DPBS. La solution peut être stockée à 2-8 °C pendant 14 j au maximum.

15. Le milieu de cryoconservation peut être préparé la veille de son utilisation, mais le pH ne devra être ajusté que 1-2 h avant l'isolement des hépatocytes. Les constituants sont indiqués au tableau 2. Il peut être nécessaire d'ajuster le pH pour une dissolution complète de l'albumine. Laisser reposer la solution pendant une nuit à 1-10 °C pour réduire la mousse. Le jour de l'utilisation, ajuster le pH du tampon à 7.8 à 11 ± 1 °C et procéder à une filtration stérile sur filtre en polyéthersulfone 0.2 µm.

16. Le tableau 2 indique comment préparer le milieu de cryoconservation avec du DMSO à 12 % et 16 % respectivement.

Tableau 2. Composition du milieu de cryoconservation

	Réactif	Pour 200 mL de préparation	Concentration
Tampon de cryoconservation pH 7.8 à 11 ± 1 °C	DMEM	160 mL	
	FBS	40 mL	20 % (v/v)
	BSA	0.5 g	0.25 % (m/v)
Milieu de cryoconservation avec DMSO à 12 %	Ajouter 1.8 mL de DMSO par fraction de 13.2 mL de tampon de cryoconservation		
Milieu de cryoconservation avec DMSO à 16 %	Ajouter 7.2 mL de DMSO par fraction de 37.8 mL de tampon de cryoconservation		

Description détaillée

Préparation de l'appareillage et des tampons le jour de l'isolement et de la cryoconservation des RT-HEP

Appareillage

17. La figure 1 représente le montage recommandé pour le dispositif de perfusion. D'autres montages sont possibles (pompe péristaltique, par exemple). Le débit de perfusé est réglé sur 10 mL/min, environ. Cependant, il peut être nécessaire d'ajuster le débit selon la taille des poissons (5 mL/min pour des poissons de 100 g, par exemple).

18. Pour perfuser deux poissons avec un seul appareillage, il est possible de subdiviser la ligne de perfusion en aval du barboteur. Une pince ou un robinet sera utilisé pour réguler le débit de perfusé dans la seconde ligne tout en commençant la perfusion du premier poisson. Il convient alors de déterminer le débit que doit avoir la pompe pour un débit de 10 mL/min dans la première ligne lorsque la seconde est fermée, ainsi que l'augmentation de débit requise au niveau de la pompe pour maintenir le débit de perfusion lorsque les deux lignes sont ouvertes.

19. La température du perfusé à la sortie de la canule doit être de 11 ± 1 °C environ (ou égale à la température à laquelle le poisson a été acclimaté) et la température du dispositif de refroidissement et du diffuseur sera réglée en conséquence.

20. Avant de commencer la perfusion du foie (cf. § 33), rincer les tubulures et le barboteur de l'appareillage de perfusion à l'éthanol à 70 % pendant 10 min environ, puis à l'eau distillée pendant 10 min et enfin au tampon de perfusion I pendant 3 min.

21. Pour rincer le barboteur, ouvrir les vannes supérieure et frontale afin de le vider. La vanne frontale étant fermée, remplir le barboteur de liquide jusqu'à ce qu'il déborde au niveau de la vanne supérieure. Puis vider la majeure partie du liquide en ouvrant la vanne frontale. Rincer plusieurs fois de cette façon.

22. Pour filtrer la suspension d'hépatocytes, fixer une membrane de filtration en nylon (100 µm, par exemple) au moyen d'une bande adhésive autour du rebord d'un bécher en verre de forme haute de 125 mL. Placer le bécher sur de la glace. La membrane

ne doit pas être tendue sur le dessus du bécher, mais présenter une dépression en son milieu pour la filtration de la suspension de RT-HEP. On notera que du nylon de mauvaise qualité peut ne pas convenir pour la filtration des hépatocytes. Les coutures formant des rebords inégaux peuvent endommager les hépatocytes.

23. Tout le matériel chirurgical nécessaire doit être disponible, et notamment : pince à dissection, petits et grands ciseaux, nacelle de pesée, set à cathéter papillon et micro-pince bulldog ou matériel de suture.

Tampons de perfusion et milieux de cryoconservation

24. Dans les 2 h précédant l'utilisation, le pH des tampons de perfusion préalablement préparés doit être ajusté au pH cible, à la température d'acclimatation des poissons (pH 7.8 à 11 ± 1 °C, par exemple), si nécessaire. Le pH des tampons de perfusion I et II, en particulier, tendra à baisser s'ils sont préparés trop longtemps à l'avance, du fait de la dissolution de CO₂ et de la formation d'acide carbonique.

Préparation des poissons et chirurgie

25. Les poissons doivent jeûner 24 h avant l'isolement des hépatocytes.

26. Au moyen d'une épuisette, on capture les poissons et on les transfère dans un aquarium ou un seau contenant 8 L de solution anesthésique (MS-222) préparée au préalable. La solution de MS-222 peut être utilisée pour anesthésier plusieurs poissons, sans perte d'efficacité, mais le nombre de poissons peut dépendre de leur taille.

27. Les poissons doivent être immergés dans la solution de MS-222 pendant au moins 1 min. Ils sont convenablement anesthésiés lorsque les mouvements operculaires ont cessé, que la perte d'équilibre et de tonus musculaire est complète et qu'ils ne répondent pas aux stimuli (une pression ferme à la base de la queue peut être utilisée pour déterminer la réponse aux stimuli). Une fois terminée la perfusion du foie (§§ 34-36), les poissons sont tués par une méthode humaine, d'un coup sec à la tête.

28. Le poids des poissons anesthésiés est consigné (cf. tableau 3 : Modèle de rapport).

29. Les poissons sont posés sur la plateforme chirurgicale, face ventrale vers le haut. Il est recommandé de pratiquer les incisions suivantes, illustrées par la figure 2 : a) incision suivant la ligne médiane, de l'orifice anal à l'isthme, en prenant soin de ne pas pénétrer trop profondément dans la cavité corporelle ; puis b) une incision latérale au niveau de l'extrémité caudale de l'incision médiane, remontant jusqu'à mi-distance environ de la surface dorsale ; et c) une incision latérale similaire juste en arrière de l'opercule.

30. Le volet ainsi formé est rabattu et retiré, ce qui découvre la cavité corporelle ; le foie doit être rouge foncé, et le cœur doit continuer à battre (figure 3). La branche ventrale de la veine porte hépatique (reliant l'intestin au hile hépatique) doit être localisée et débarrassée avec précaution de tout tissu conjonctif faisant obstacle à la vue.

31. La pompe à perfuser, réglée sur 10 mL/min, est mise en marche. Si deux poissons sont perfusés avec le même appareillage, la seconde ligne de perfusion doit être clampée dans un premier temps. Les deux poissons doivent en être au stade où ils sont prêts pour la perfusion : anesthésiés, pesés, cavité corporelle découverte et veines portes hépatiques localisées.

32. Le tampon de perfusion I coulant dans le système de perfusion, un cathéter papillon 21 g est introduit avec précaution dans la veine porte en direction du foie, et maintenue par une micro-pince bulldog (figure 4). Des cathéters de calibre différent peuvent être préférés, selon la taille du poisson. Si l'on ne dispose pas de micro-pince bulldog, il est possible de recourir à du matériel de suture, ou de comprimer avec les doigts, comme indiqué in Johanning et al., 2012.

33. Les vaisseaux sanguins reliant la face antérieure du foie au cœur sont sectionnés, ou le cœur peut être incisé ou complètement retiré afin de permettre l'écoulement du perfusé (figure 4). Si deux poissons sont perfusés avec le même appareillage, la seconde ligne de perfusion doit être déclampée juste avant la canulation de la veine porte du second poisson, et le débit de la pompe doit être augmenté pour fournir le débit de perfusion requis (10 mL/min, par exemple) dans les deux lignes de perfusion. Le foie du premier poisson est perfusé avec du tampon de perfusion I pendant que le second poisson est préparé (1 min environ).

Perfusion du foie

34. La perfusion du foie est menée tout d'abord avec du tampon de perfusion I pendant 8-12 min. Le blanchiment du foie doit être manifeste dès la première minute de perfusion (figure 4). La perfusion se poursuit avec du tampon de perfusion II pendant 12-15 min, jusqu'à ce que le foie soit visiblement assoupli. Après 5 min environ de perfusion avec le tampon II, on pourra vérifier l'assouplissement du foie en exerçant de temps en temps une pression au moyen d'une pince à dissection à embouts émoussés. En règle générale, une perfusion de plus de 15 min avec le tampon II entraînerait une digestion excessive, et n'est donc pas recommandée.

35. Lorsque le foie est suffisamment assoupli, la digestion par la collagénase est interrompue par perfusion pendant 3 min avec du tampon de perfusion III.

36. Le changement de perfusé peut être accompli en transférant rapidement la tubulure de sortie d'un réservoir de tampon au suivant, ou en utilisant une ligne à plusieurs voies munie d'une vanne permettant de changer de tampon. L'inclusion d'un barboteur dans l'appareillage de perfusion permettra d'éviter que de l'air introduit dans la ligne de perfusion pendant le changement de tampon n'atteigne le foie.

Isolement des RT-HEP

37. Le flux de tampon de perfusion III est interrompu et le cathéter est retiré. Au moyen de petits ciseaux tranchants, le foie est prélevé en même temps que la vésicule biliaire intacte. La vésicule biliaire est retirée avec précaution (afin d'éviter la rupture), et le foie est transféré dans une nacelle de pesée contenant ~ 30 mL de tampon de perfusion III glacé (figure 5). En cas de rupture de la vésicule biliaire au cours de ce processus, le foie sera rincé avec du tampon de perfusion III de façon à éliminer toute trace de bile avant le transfert dans la nacelle de pesée contenant du tampon de perfusion III.

38. Au moyen de pinces à dissection tranchantes ou avec les extrémités de petits ciseaux tranchants, on déchire la capsule de Glisson et l'on agite doucement le foie dans du tampon de perfusion III afin de libérer les hépatocytes (figure 6). Le foie peut être raclé avec précaution à l'aide d'une pince à dissection ou de ciseaux afin de faciliter la récupération des hépatocytes. Pour recueillir un nombre suffisant d'hépatocytes, il peut

être nécessaire de procéder au raclage et à l'agitation douce de la capsule hépatique pendant plusieurs minutes.

39. La suspension d'hépatocytes bruts est filtrée à travers la membrane en nylon et les hépatocytes sont recueillis dans le bécher (figure 7) préparé selon les indications du § 22. Il est possible de presser doucement le tissu conjonctif hépatique restant contre la membrane afin de récupérer plus d'hépatocytes ; toutefois, une manipulation excessive produira des hépatocytes de moins bonne qualité (du fait, notamment, de la formation de bulles).

40. Il convient de prétraiter la membrane avec une petite quantité de tampon de perfusion III avant d'y verser les hépatocytes, afin de réduire au minimum les contraintes de cisaillement. Une autre solution consiste à acheter des inserts de tubes à membrane de nylon, destinés à être utilisés dans des tubes coniques de 50 mL. Ces inserts de tubes doivent également être prétraités avec une petite quantité de tampon de perfusion III.

41. Avant de transférer les hépatocytes obtenus par filtration dans des tubes à centrifuger de 50 mL, faire tourner doucement le bécher afin de répartir uniformément les hépatocytes. La suspension d'hépatocytes bruts est centrifugée pendant 3 min à $50 \times g$, 4 °C.

42. Les gonades (ovaires ou testicules) sont intégralement retirées et pesées à 0.01 g près. L'indice gonado-somatique (IGS) de l'animal donneur est déterminé par division du poids des gonades par le poids total de l'animal ($IGS = (100 \times \text{masse des gonades}) / \text{masse totale de l'animal}$). Le poids des gonades et l'IGS sont consignés (cf. tableau 3 : Modèle de rapport). Les gonades (testicules ou ovaires) se présentent sous la forme de deux brins de tissu longeant la cavité péritonéale du côté de la face ventrale des reins. La maturité sexuelle de la truite peut être déterminée d'après l'IGS. En règle générale, les mâles ayant un $IGS < 0.05$ et les femelles ayant un $IGS < 0.5$ peuvent être considérés comme sexuellement immatures. Une autre solution pour déterminer la maturité sexuelle est de recourir à l'histologie (Blazer, 2002). On trouvera des descriptions précises du développement des gonades chez la truite in Billard et Escaffre, 1975 ; Gomez et al., 1999 ; Le Gac et al., 2001.

43. Le surnageant obtenu au § 41 est aspiré jusqu'au haut de la partie rétrécie du tube à centrifuger (jusqu'à la marque de 4 mL, environ), en prenant soin de ne pas remuer le culot d'hépatocytes. Le surnageant peut être aspiré soit manuellement, au moyen d'une pipette sérologique, soit au moyen d'une pompe à vide, mais ne doit pas être éliminé.

44. On ajoute alors 5 mL de tampon de perfusion III et l'on met les hépatocytes en suspension en maintenant le tube à centrifuger à un angle de 60 ° environ et en tapotant le fond du tube sur le dos de la main opposée. Après avoir vérifié visuellement la mise en suspension complète des hépatocytes (absence d'amas visibles), on ajuste le volume final à 32 mL avec du tampon de perfusion III.

45. Dans chaque tube à centrifuger de 50 mL, on prélève 16 mL de suspension d'hépatocytes, qui sont transférés dans un nouveau tube à centrifuger de 50 mL (de telle sorte que tous les tubes contiennent 16 mL de suspension d'hépatocytes). Ajouter à chaque tube 14 mL de solution de Percoll à 90 % (4 °C ou glace) et bien mélanger en retournant doucement les tubes.

46. Centrifuger le mélange pendant 10 min à $96 \times g$, 4 °C. Retirer immédiatement le surnageant par aspiration jusqu'à la limite supérieure du culot, et mettre les hépatocytes

en suspension dans 20 mL environ de milieu L-15 (pH 7.8 à 11 ± 1 °C). Deux tubes d'hépatocytes sont réunis dans un même tube.

47. Après centrifugation de la suspension pendant 3 min à 50 × g, 4 °C afin de faire sédimenter les hépatocytes, et remise en suspension du culot d'hépatocytes dans 20 mL de L-15, il est possible de réunir deux tubes en un, selon le nombre de tubes nécessaires pour la quantité d'hépatocytes isolés. Cette étape peut être répétée.

48. Puis le culot d'hépatocytes est mis en suspension dans 20-40 mL de L-15, selon la concentration d'hépatocytes attendue. Toutes les suspensions doivent être réunies dans un seul tube, à ce stade.

49. Le nombre total d'hépatocytes et leur viabilité sont déterminés à l'aide d'un hémocytomètre avec par exemple une solution de bleu de trypan à 0.04 %. Consigner les données relatives à la numération et à la viabilité des hépatocytes (cf. tableau 3 : Modèle de rapport).

50. Le nombre total d'hépatocytes recueillis à l'issue de la procédure d'isolement est calculé comme suit : concentration d'hépatocytes viables (hépatocytes/mL) × volume de la suspension (avant la numération cellulaire ; mL) = nombre total d'hépatocytes. Le nombre total d'hépatocytes disponibles pour la cryoconservation est calculé selon le même principe : concentration d'hépatocytes viables (hépatocytes/mL) × volume de la suspension (après la numération cellulaire ; mL).

Cryoconservation des RT-HEP

51. Au cours de toute la procédure, les hépatocytes primaires et les milieux de cryoconservation doivent être maintenus sur de la glace, sauf spécifications contraires.

52. Le pH de tous les milieux de cryoconservation doit être ajusté, à la température de maintien des poissons (11 ± 1 °C, par exemple), dans les 2 h précédant l'utilisation, et ils doivent être conservés sur de la glace ou dans un réfrigérateur à 4 °C.

53. La procédure décrite dans ce qui suit est conçue pour 50 flacons cryogéniques contenant chacun 1.5 mL de 10 × 10⁶ hépatocytes/mL (15 × 10⁶ hépatocytes par flacon cryogénique). Cinquante flacons seront nécessaires pour 750 × 10⁶ hépatocytes, mais le nombre de flacons peut être augmenté ou réduit selon le nombre d'hépatocytes disponibles pour la cryoconservation.

54. Déterminer la concentration d'hépatocytes de la suspension et calculer le volume requis pour 375 × 10⁶ hépatocytes. Les hépatocytes doivent présenter une concentration telle que le volume requis soit inférieur à 50 mL (concentration minimale d'hépatocytes de 7.5 × 10⁶ hépatocytes/mL).

$$\begin{aligned} & 375 \times 10^6 \text{ hépatocytes} / \text{concentration de la suspension (hépatocytes/mL)} \\ & = \text{volume requis (mL)} \end{aligned}$$

55. Transférer 375 × 10⁶ hépatocytes dans deux tubes à centrifuger propres de 50 mL, et ajouter à chaque tube du tampon de cryoconservation afin d'obtenir un volume final de 50 mL (cf. tableau 2).

56. Centrifuger les hépatocytes pendant 5 min à 50 × g, 4 °C afin de sédimenter les hépatocytes. Dans chaque tube, aspirer le surnageant jusqu'à la limite supérieure du culot, puis ajouter du milieu de cryoconservation jusqu'à 12.5 mL. En supposant qu'il n'y ait pas de perte d'hépatocytes à cette étape, la densité sera de 30 × 10⁶ hépatocytes/mL.

-
57. Mettre les hépatocytes en suspension en retournant doucement les tubes et en les tapotant comme indiqué plus haut. Ajouter lentement 6.25 mL de milieu de cryoconservation contenant 12 % de DMSO, en faisant tourner doucement les hépatocytes.
58. Maintenir les hépatocytes sur de la glace pendant 5 min, puis ajouter lentement 18.75 mL de tampon de cryoconservation contenant 16 % de DMSO en faisant tourner doucement les hépatocytes. Le volume final est de 37.5 mL à 10×10^6 hépatocytes/mL.
59. Maintenir les hépatocytes sur de la glace pendant 5 min, puis mettre en suspension en retournant doucement les tubes. Transférer des aliquotes de 1.5 mL de la suspension finale d'hépatocytes dans les flacons cryogéniques de 1.8 mL. Afin d'assurer une densité d'hépatocytes appropriée, mélanger ou faire tourner doucement les hépatocytes dans la suspension après chaque transfert.
60. Cryoconserver les hépatocytes en plaçant les flacons dans la phase vapeur de l'azote liquide.
61. Stocker les flacons dans la phase vapeur de l'azote liquide.

*Modèle de rapport***Tableau 3. Modèle de rapport**

Espèce (*O. mykiss*, par exemple) : _____

Souche (s'il y a lieu) : _____

Origine des poissons (nom de l'écloserie, par exemple) : _____

Photopériode (naturelle, par exemple) : _____

Température de l'eau (°C) : _____

Origine de l'eau (puits, par exemple) : _____

Débit d'eau (L/min) : _____

pH : _____

Oxygène dissous (mg/L) : _____

Densité de poissons (kg/litre dans l'aquarium) : _____ ou _____

Nombre de poissons/aquarium : _____

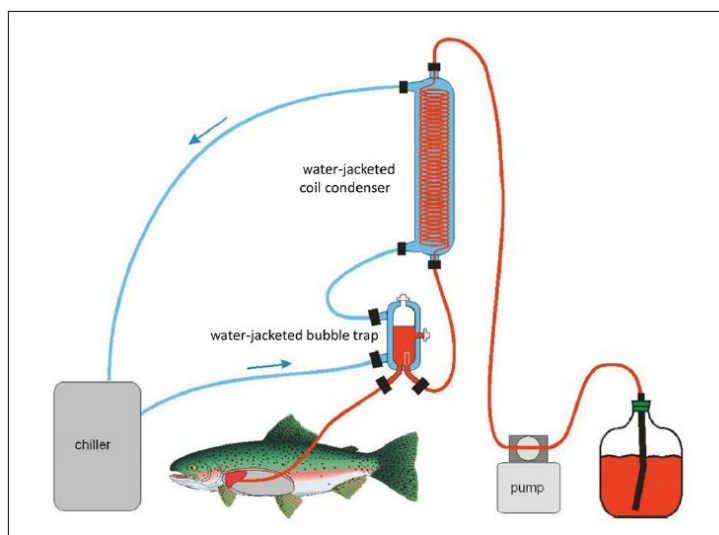
Régime alimentaire (en % du poids corporel, par exemple) : _____

Type d'aliments (aliment pour truite Silver Cup de Nelson, par exemple) : _____

Poisson n°	Poids du poisson (g)	Sexe (femelle ou mâle) (si possible)	Poids du foie (g)	FPoids des gonades (g)	IGS (poids des gonades/poids du poisson)
1					
2					
3					
4					
5 etc.					

Figures

Figure 1. Montage du système de perfusion du foie des poissons en vue d'obtenir des hépatocytes primaires.



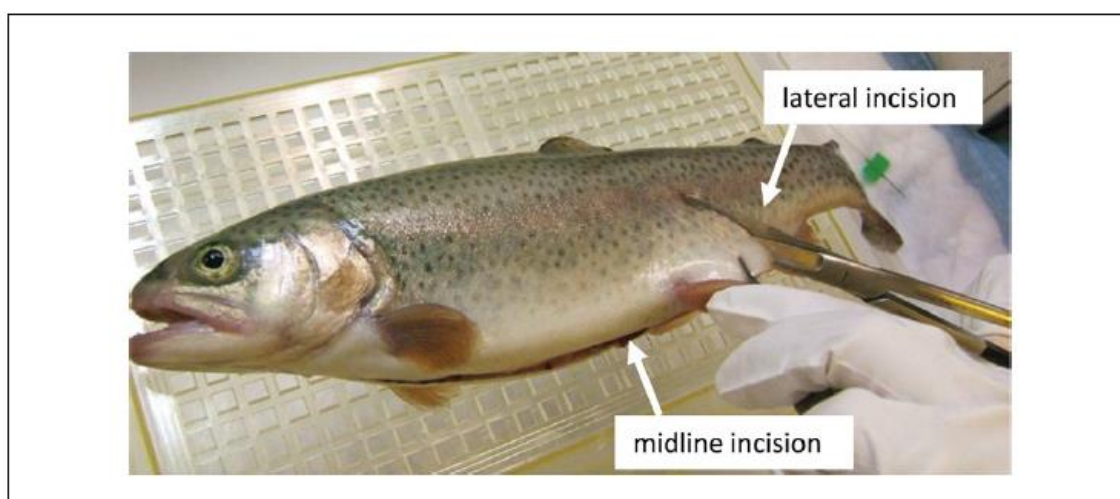
*Légendes de la figure*Note :

Condenseur à serpentin à chemise d'eau (water-jacketed coil condenser). Barboteur à chemise d'eau (water-jacketed bubble trap). Dispositif de refroidissement (chiller). Pompe (pump).

Le perfusât est pompé à travers un condenseur à serpentin à chemise d'eau suivi d'un barboteur à chemise d'eau, avant perfusion du foie. L'eau passe par un dispositif de refroidissement, de telle sorte que le perfusât sortant du barboteur est maintenu à la température à laquelle les poissons ont été acclimatés. La ligne de perfusion peut être subdivisée, à la sortie du barboteur, pour perfuser deux poissons simultanément (figure utilisée avec l'autorisation de Fay et al., 2015).

Source: Fay et al. (2015).

Figure 2. Photographie montrant une incision selon la ligne médiane, de l'orifice anal à l'isthme, et une incision latérale remontant dorsalement depuis l'orifice anal



Note : Légende de la figure : incision latérale incision ligne médiane.

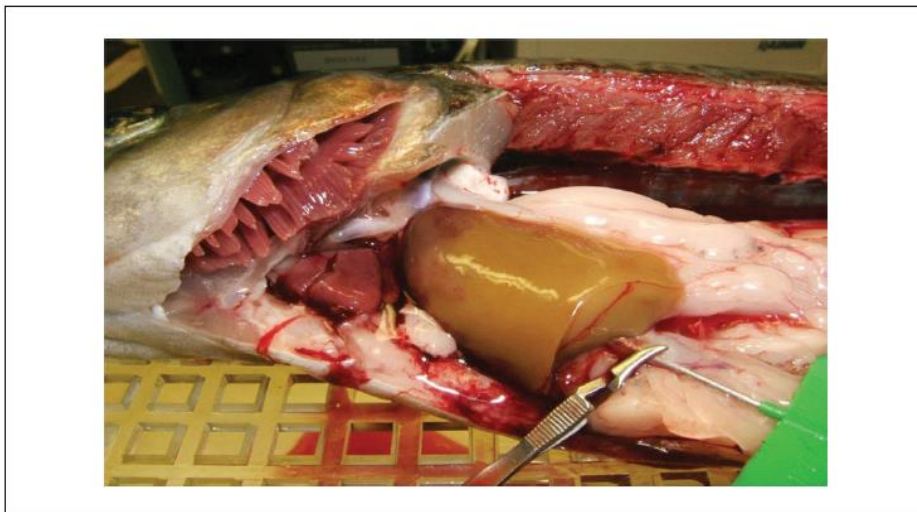
Source: Fay et al. (2015).

Figure 3. Photographie montrant le foie du poisson, après retrait de la paroi



Note : La flèche indique une branche ventrale de la veine porte hépatique.
Source : Fay et al. (2015).

Figure 4. Photographie montrant un foie canulé.



Note : Le foie blanchit immédiatement après insertion du cathéter et perfusion avec du tampon. Sectionner les vaisseaux menant au cœur ou inciser les cavités cardiaques pour permettre l'écoulement du perfusat.
Source : Fay et al. (2015).

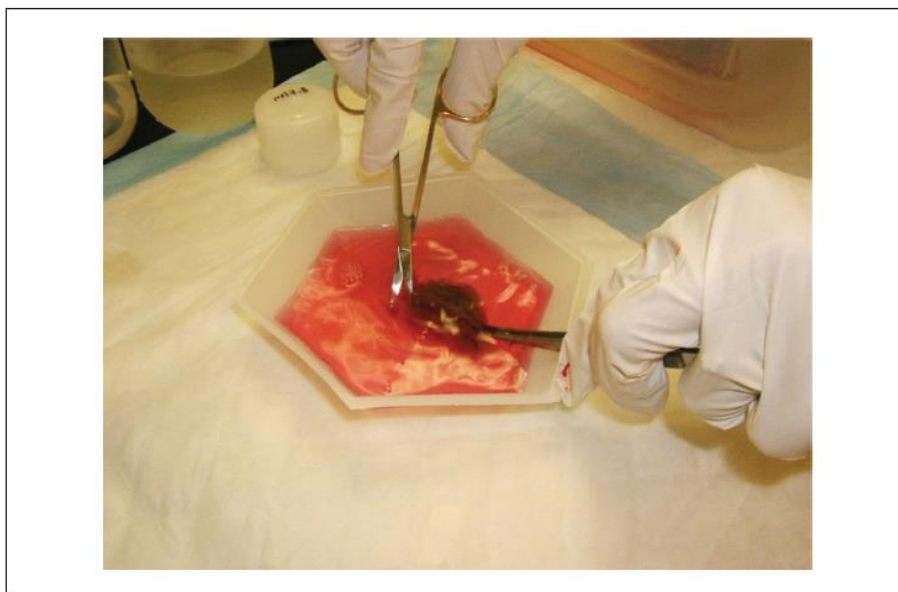
Figure 5. Photographie montrant le retrait du foie



Source : Fay et al. (2015).

Figure 6. Indiquez le titre ici

Indiquez le sous-titre ici. S'il n'y a pas de sous-titre, merci de supprimer cette ligne.



Source: Fay et al. (2015).

Figure 6. Photographie montrant la collecte mécanique des hépatocytes



Source: Fay et al. (2015).

Figure 7. Photographie montrant la suspension d'hépatocytes bruts après filtration à travers une membrane de nylon 100 μm



Source: Fay et al. (2015).

References

- Billard, R. and Escaffre, A. (1975), Identification of spermatogenesis stages in the rainbow trout based on gonad morphology and spermiation (in French), *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture* 256:111-118.
- Blazer, V. (2002), Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes, *Fish Physiology and Biochemistry* 26:85-1201.
- Fay, K.A. et al. (2014), Optimizing the use of rainbow trout hepatocytes for bioaccumulation assessments with fish, *Xenobiotica* 44:345-351.
- Fay, K.A. et al. (2015), Determination of metabolic stability using cryopreserved hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Current Protocols in Toxicology* 65:4.42.1-29.
- Gomez, J.M. et al. (1999), Growth hormone receptors in ovary and liver during gametogenesis in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journal of Reproduction and Fertility* 115:275-285.
- Johanning, K. et al. (2010), In vitro rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 metabolism assay: optimizing the assay conditions to determine chemical bioaccumulation potential, SETAC Europe 20th Annual Meeting, Seville, Spain.
- Johanning, K. et al. (2012), Assessment of metabolic stability using the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fraction. *Current Protocols in Toxicology* 53:14.10.1-28.
- Le Gac, F. et al. (2001), In vivo and in vitro effects of prochloraz and nonylphenol ethoxylates on trout spermatogenesis, *Aquatic Toxicology* 53:187-200.
- Mommsen, T. et al. (1994), Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization, In: *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol. 3, Elsevier, Amsterdam, pp. 355-372..
- Mudra, D. R. and Parkinson, A. (2001), Preparation of hepatocytes, *Current Protocols in Toxicology* 8:14.2.1-13.
- OECD (2018), Multi-laboratory ring trial to support development of OECD test guidelines on determination of in vitro intrinsic clearance using cryopreserved rainbow trout hepatocytes and liver S9 sub-cellular fractions, Series on Testing and Assessment No. 281, OECD Publishing, Paris.
- Seglen, P. (1976), Preparation of isolated rat liver cells, *Methods in Cell Biology* 13:29-83.
- Segner, H. (1998), Isolation and primary culture of teleost hepatocytes, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*: 120:71-81.

ANNEXE 3

Caractérisation des RT-HEP

1. La viabilité (en %) des RT-HEP fraîchement isolés doit être caractérisée par un test d'exclusion au bleu de trypan, par exemple (cf. annexe 2). Le rendement (= % d'hépatocytes viables obtenus après décongélation par rapport au nombre de RT-HEP viables initialement cryoconservés), de même que la viabilité (en %) des RT-HEP décongelés après cryoconservation, doivent être déterminés (cf. annexe 5).
2. La capacité de chaque lot d'hépatocytes à catalyser les réactions de biotransformation de phases I et II doit être évaluée. Tout en supposant que l'activité des RT-HEP est préservée lors de la cryoconservation, il est préférable de pratiquer ces tests de caractérisation tant sur les hépatocytes fraîchement isolés que sur les cellules décongelées.
3. Le tableau 1 fournit une liste de tests standardisés proposés pour la mesure de l'activité de phases I et II ; ces tests sont décrits brièvement in Johanning et al., 2012. Le tableau 1 donne un aperçu des méthodes les plus courantes, des substrats et des documents de référence. Les résultats de ces tests doivent être inclus dans le rapport d'essai.
4. L'activité du matériel biologique peut également être évaluée sur des produits chimiques d'essai connus, bien caractérisés.
5. Lorsqu'ils sont appliqués aux RT-HEP, ces tests sont généralement pratiqués sur le lysat obtenu par sonication d'une suspension d'hépatocytes. En règle générale, les RT-HEP sont dilués à une concentration de 2×10^6 hépatocytes/mL et soniqués brièvement au moyen d'un broyeur cellulaire à ultrasons tenu à la main (Fay et al., 2014) ; cependant, la concentration d'hépatocytes nécessaire peut varier selon les spécifications du test. Les résultats sont ensuite normalisés en teneur en protéines, déterminée selon une méthode standard ([Bradford, 1976 ; Lowry et al., 1951], par exemple) ou au moyen d'un kit de dosage des protéines du commerce, selon les instructions du fabricant.
6. Lorsque la voie probable par laquelle s'effectue la biotransformation d'un produit chimique testé est connue, il peut être judicieux d'évaluer cette voie à l'avance, si l'on dispose d'un test standardisé pour la mesure de cette activité. Des tests évaluant des effets au bout d'un temps fixé (activité enzymatique à 30 min, par exemple) ou des méthodes cinétiques de détermination de l'activité peuvent être utilisés. En cas de comparaison avec d'autres laboratoires, on tiendra compte des conditions précises de conduite des essais (concentration de substrat, concentration de protéines, durée(s) d'incubation, effet mesuré ou points dans le temps, notamment).

Tableau 1 : Tests d'activité enzymatique courants, substrats et documents de référence utilisables pour caractériser l'activité des RT-HEP, généralement réalisés sur des lysats de cellules.

	Test / Activité	Enzyme	Type de réaction	Substrat	Référence(s)
Phase I	O-désalkylation de l'éthoxycoumarine (ECOD)	CYP1A	O-désalkylation	7-Éthoxycoumarine	Edwards et al., 1984 ; Cravedi, Perdu-Durand et Paris, 1998 ; Leguen et al., 2000
	O-désalkylation de la 7-éthoxyrésorufine (EROD)	CYP1A	O-désalkylation	7-Éthoxyrésorufine	Nabb et al., 2006
	O-désalkylation de la 7-méthoxyrésorufine (MROD)	CYP1A	O-désalkylation	7-Méthoxyrésorufine	Nabb et al., 2006
	O-désalkylation de la 7-pentoxyrésorufine (PROD)	CYP2B	O-désalkylation	7-Pentoxyrésorufine	Nabb et al., 2006
	6 β -hydroxylation de la testostérone	CYP3A	Hydroxylation de l'anneau aromatique	Testostérone	Oesch et al., 1992
	6-hydroxylation de la chlorzoxazone	CYP2E1	Hydroxylation de l'anneau aromatique	Chlorzoxazone	Peter et al., 1990
	11-hydroxylation de l'acide laurique	CYP2K1	Hydroxylation de la chaîne aliphatique	Acide laurique	Nabb et al., 2006
Phase II	Hydrolyse de l'acétate de p-nitrophényle	Carboxyl-estérase	Hydrolyse	Acétate de p-nitrophényle	Wheelock et al., 2005
	Conjugaison du CDNB au glutathion	GST	Conjugaison au glutathion	1-Chloro-2,4-dinitrobenzène	Habig, Pabst et Jakoby, 1974
	Glucuronidation du p-nitrophénol	UGT	Glucuronidation	p-Nitrophénol	Castren et Oikari, 1983 ; Ladd, Fitzsimmons, et Nichols, 2016

References

Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72:248–254.

Castren, M., and Oikari A. (1983), Optimal assay conditions for liver UDP-glucuronosyltransferase from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 76:365–369.

Cravedi, J.P., Perdu-Durand, E., and Paris, A. (1998), Cytochrome P450-dependent metabolic pathways and glucuronidation in trout liver slices. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 121:267–275.

- Edwards, A.M. et al. (1984), 7-ethoxycoumarin deethylase activity as a convenient measure of liver drug metabolizing enzymes: Regulation in cultured hepatocytes, *Biochemical Pharmacology* 33:1537–1546.
- Fay, K.A. et al (2014), Intra- and interlaboratory reliability of a cryopreserved trout hepatocyte assay for the prediction of chemical bioaccumulation potential. *Environmental Science & Technology* 48:8170-8178.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. (1974), Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *Journal of Biological Chemistry* 249:7130–7139.
- Johanning, K. et al. (2012). Assessment of metabolic stability using the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fraction. *Current Protocols in Toxicology* 53:14.10.1-28.
- Ladd, M.A., Fitzsimmons, P.N., and Nichols, J.W., (2016), Optimization of a UDP-glucuronosyltransferase assay for trout liver S9 fractions: activity enhancement by alamethicin, a pore-forming peptide, *Xenobiotica* 46:1066-1075.
- Leguen, I. et al. (2000), Xenobiotic and steroid biotransformation activities in rainbow trout gill epithelial cells in culture, *Aquatic Toxicology* 48:165–176.
- Lowry, O. H. et al. (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193:265–75.
- Nabb, D.L. et al. (2006), Comparison of basal level metabolic enzyme activities of freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat. *Aquatic Toxicology* 80:52–59.
- Oesch, F. et al. (1992), Improved sample preparation for the testosterone hydroxylation assay using disposable extraction columns. *Journal of Chromatography* 582:232–235.
- Peter, R. et al. (1990), Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1, *Chemical Research in Toxicology* 3:566–573.
- Wheelock, C. E. et al. (2005), Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos, *Aquatic Toxicology* 74: 172-192.

ANNEXE 4**Inactivation à la chaleur des RT-HEP**

1. Il est suggéré aux laboratoires de préparer à l'avance une grande quantité de RT-HEP enzymatiquement inactifs et de les congeler sous forme d'aliquotes (de 5 mL, par exemple).
2. Les RT-HEP actifs inutilisés à la fin d'un essai peuvent faire l'objet ultérieurement d'une inactivation à la chaleur.
3. Équipement :
 - Plaque chauffante
 - Bêcher rempli d'eau (bain-marie)
 - Récipient utilisé pour faire bouillir les cellules dans le bain-marie
 - Cylindre gradué
4. La suspension de RT-HEP doit être diluée dans du milieu L-15 à la densité cellulaire souhaitée pour l'essai (2×10^6 hépatocytes/mL, par exemple). Lorsque des RT-HEP cryoconservés sont utilisés, un protocole de décongélation abrégé peut être suffisant.
5. Le volume de la suspension est consigné et la suspension est transférée dans un récipient résistant à la chaleur (en verre, de préférence).
6. Un bêcher d'eau est chauffé sur une plaque chauffante jusqu'à ébullition de l'eau. Le récipient contenant la suspension de RT-HEP est placé dans le bain d'eau bouillante, et la suspension est portée à ébullition lente pendant 15 min.
7. Lorsqu'elle a refroidi, la suspension est transférée dans un cylindre gradué et le volume est ajusté par addition de milieu L-15 ou d'eau, afin de maintenir la densité d'hépatocytes souhaitée.
8. La suspension de RT-HEP enzymatiquement inactifs est stockée à -20 ± 1 °C ou -0 ± 1 °C.

ANNEXE 5

Decongélation des RT-HEP cryoconservés

1. Les RT-HEP cryoconservés doivent être décongelés conformément aux instructions du fournisseur.
2. Si les RT-HEP ont été isolés et cryoconservés selon le protocole de l'annexe 2, on suivra la procédure décrite ici pour les décongeler. Une viabilité élevée (> 80 %) est généralement obtenue après décongélation des RT-HEP cryoconservés, alors que le rendement (taux de récupération, c'est-à-dire nombre de RT-HEP viables obtenus après décongélation rapporté au nombre de RT-HEP viables initialement cryoconservés) est généralement de 25-45 % (Fay et al., 2014a, 2014b ; Markell et al., 2014 ; Mingoia et al., 2010).

Appareillage et matériel

3. L'appareillage et le matériel suivants sont nécessaires :
 - Centrifugeuse réfrigérée (pour tubes de 50 mL, par exemple)
 - Tubes à centrifuger coniques (50 mL, par exemple)
 - Bain-marie (température ambiante)
 - Pipette de 1000 µL avec embouts
 - Pipettes sérologiques (2.5-25 mL) et aide au pipetage
 - Flacons cryogéniques contenant 1.5 mL de RT-HEP cryoconservés à 10×10^6 cellules/mL
 - Tubes de microcentrifugation de 1.5 mL et porte-tubes
 - Filtres pour filtration stérilisante sous vide (membrane polyéthersulfone (PES) 0.2 µm)
 - Milieu de récupération des RT-HEP (cf. tableau 1)
 - Milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM), faible taux de glucose, avec rouge de phénol
 - Sérum fœtal bovin (SFB) non inactivé à la chaleur
 - Albumine sérique bovine (ASB)
 - Milieu de Leibovitz L-15 (L-15) avec glutamine, sans rouge de phénol
 - Bleu de trypan, 0.4 %
 - NaOH et HCl 1 N (pour l'ajustement du pH)

*Préparation des milieux**Détermination du nombre total de RT-HEP et des volumes de milieux nécessaires*

4. Dans l'hypothèse d'un rendement de 25-45 % (§ 2), 2 flacons contenant chacun 1.5 mL de suspension à 10×10^6 cellules/mL devraient fournir $\sim 7.5 - 13.5 \times 10^6$ RT-HEP viables.

5. On déterminera le nombre total de flacons cryogéniques nécessaires pour fournir suffisamment de RT-HEP, sachant que la méthode de déplétion du substrat décrite dans la présente Ligne directrice est appliquée à une concentration de $1-2 \times 10^6$ cellules/mL.

6. Pour un meilleur rendement, il est recommandé à l'utilisateur de décongeler 2-3 flacons en même temps dans un tube de 50 mL avec du milieu de récupération. La décongélation d'un seul flacon peut se traduire par un rendement $< 25\%$ après cryoconservation.

7. Le volume de milieu de récupération sera déterminé en supposant qu'il faut 44-45 mL par tube (cf. ci-après). Le volume total de milieu L-15 peut être déterminé sur la base d'un volume de ~ 100 mL par tube.

Préparation du milieu de récupération (avant le jour de l'essai)

8. Le milieu de récupération doit être préparé avant la date de l'essai en utilisant les constituants indiqués au tableau 1. Le milieu est soumis à une filtration stérilisante, et il peut être nécessaire d'ajuster le pH. Laisser la solution reposer pendant une nuit à $1-10^\circ\text{C}$ pour réduire la mousse.

Tableau 1 : Milieu de récupération

Réactif	Pour 100 mL de préparation	Concentration finale
DMEM	90 mL	
SFB	10 mL	10 % (v/v)
ASB	0.25 g	0.25 % (m/v)

Préparation des milieux (le jour de l'essai)

9. Le jour de l'essai, le pH du milieu de récupération doit être réajusté à 7.8 ± 0.1 à $11 \pm 1^\circ\text{C}$.

10. 42 mL de milieu de récupération sont ajoutés à chaque tube de 50 mL. Un tube supplémentaire de milieu de récupération est préparé pour le lavage des flacons cryogéniques (cf. ci-après). Le milieu de récupération est conservé à température ambiante.

11. Le pH d'environ 100-150 mL de milieu L-15 (milieu d'incubation) est ajusté à pH 7.8 à $11 \pm 1^\circ\text{C}$ au moyen de HCl ou NaOH 1 N. Le L-15 est conservé sur de la glace.

Procédure de décongélation

12. Les flacons cryogéniques sont retirés de la phase vapeur de l'azote liquide et immédiatement placés dans un bain-marie à température ambiante ; pour cela, ils sont maintenus par leurs bouchons au-dessus du niveau de l'eau de telle sorte que les suspensions congelées se trouvent immergées. Les flacons sont agités doucement d'un

côté à l'autre jusqu'à ce que leur contenu devienne mobile et qu'il reste un petit cristal de glace. Le processus de décongélation dure habituellement 2 min 15 sec environ. Si l'emplacement où sont conservés les RT-HEP cryoconservés et le laboratoire où s'effectue la décongélation diffèrent, il est recommandé de transporter les flacons sur de la glace carbonique.

13. Le contenu de 2-3 flacons est versé dans un tube à centrifuger de 50 mL contenant 42 mL de milieu de récupération (à température ambiante).

14. Les flacons cryogéniques vidés sont rincés avec du milieu de récupération, de façon à mettre en suspension les RT-HEP restants : 1 mL de milieu de récupération provenant du tube supplémentaire est versé dans chaque flacon cryogénique vide, qui est bouché et retourné une fois pour mélanger. Le produit du rinçage est ajouté au tube de 50 mL.

15. Les tubes à centrifuger sont bouchés et retournés doucement, puis centrifugés pendant 5 min à $50 \times g$, 4 °C.

16. Le surnageant est aspiré jusqu'au début de la partie rétrécie du tube à centrifuger (à 4 mL, environ), en prenant soin de ne pas remuer le culot de cellules. Une aspiration trop proche du culot peut entraîner une baisse de rendement. Pour que les résultats soient cohérents, le surnageant doit être aspiré jusqu'à la section conique du tube à toutes les étapes de lavage. Le surnageant peut être aspiré soit manuellement, au moyen d'une pipette, soit au moyen d'une pompe à vide, mais ne doit pas être éliminé.

17. 5 mL de milieu L-15 (pH 7.8 ± 0.1 , 4 °C ou glacé) sont ajoutés au tube à centrifuger et le culot cellulaire est mis en suspension. On procédera avec douceur, en tapotant le côté du tube à centrifuger contre le dos de la main opposée. Les suspensions de 2 tubes sont réunies dans un même tube, s'il y a lieu, et tous les tubes sont ajustés à un volume final de 45 mL avec du L 15. Les tubes sont bouchés et retournés une fois puis centrifugés à $50 \times g$ pendant 5 min à 4 °C.

18. Les étapes décrites aux § 12 et 13 sont répétées si un plus grand nombre de flacons sont décongelés et utilisés. Les RT-HEP sont à nouveau réunis dans un seul tube à centrifuger, s'il y a lieu, et le volume final est ajusté à 45 mL par addition de L-15.

19. Le tube est bouché et retourné une fois, puis centrifugé à $50 \times g$ pendant 3 min à 4 °C.

20. Le surnageant est aspiré jusque juste en-dessous (~2 mm) de la section conique du tube à centrifuger, et 0.75 mL environ de L-15 est ajouté par flacon cryogénique décongelé. Le culot de RT-HEP est mis en suspension.

21. Le volume de suspension est mesuré au moyen d'une pipette sérologique de taille appropriée.

22. Les RT-HEP viables et morts sont comptés au moyen d'un hémocytomètre et de bleu de trypan 0.04 %, par exemple, et dilués à la densité cellulaire souhaitée, comme indiqué in Fay et al., 2015. Il est possible d'utiliser d'autres méthodes de comptage des cellules (compteurs de cellules, par exemple).

23. Le rendement (% de RT-HEP récupérés après cryoconservation) est calculé à partir du volume de cellules en suspension (cf. § 21 ci-dessus) et des résultats des comptages de cellules.

Nombre de RT-HEP viables après décongélation	=	Densité moyenne de RT-HEP viables d'après le comptage (cf. § 22)	x	Volume de la suspension avant le comptage des RT-HEP
---	---	--	---	--

Rendement (% de récupération des RT-HEP)	=	100 x (Nombre de RT-HEP viables après décongélation / Nombre de RT-HEP viables cryoconservés initialement)
---	---	--

24. La suspension de RT-HEP est diluée à la densité de cellules finale souhaitée par addition d'un volume approprié de milieu L-15.
25. La suspension de RT-HEP doit être conservée sur de la glace jusqu'à utilisation.

References

- Fay, K.A. et al. (2014a), Optimizing the use of rainbow trout hepatocytes for bioaccumulation assessments with fish, *Xenobiotica* 44:345-351.
- Fay, K.A. et al. (2014b), Intra- and interlaboratory reliability of a cryopreserved trout hepatocyte assay for the prediction of chemical bioaccumulation potential, *Environmental Science & Technology* 48:8170-8178.
- Fay, K.A. et al. (2015), Determination of metabolic stability using cryopreserved hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Current Protocols in Toxicology* 65:4.42.1-29.
- Markell, L.K. et al. (2014), Endocrine disruption screening by protein and gene expression of vitellogenin in freshly isolated and cryopreserved rainbow trout hepatocytes, *Chemical Research in Toxicology* 27:1450-1457.
- Mingoia, R.T. et al. (2010), Cryopreserved hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A validation study to support their application in bioaccumulation assessment, *Environmental Science & Technology* 44:3052-3058.

ANNEXE 6

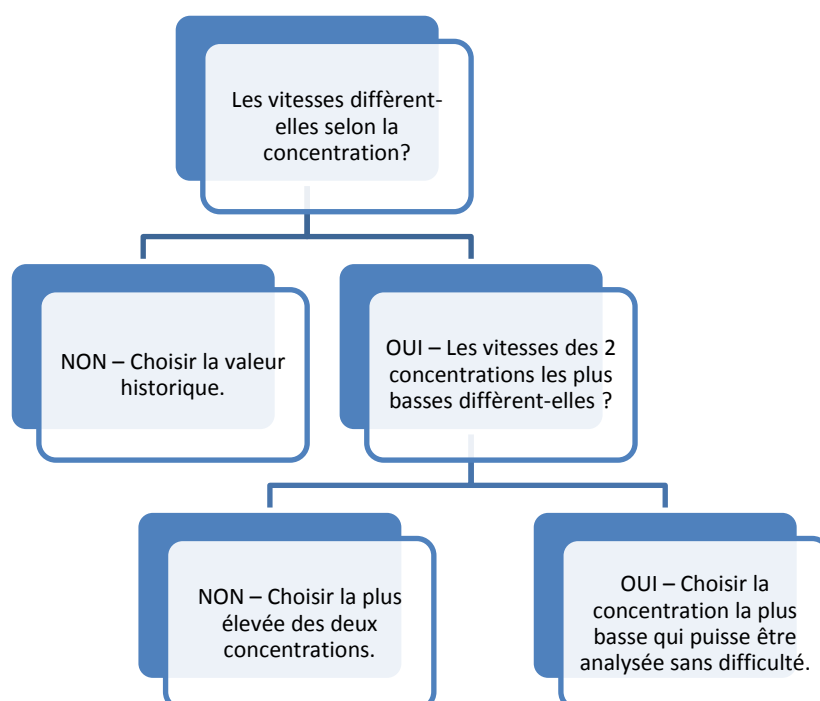
Essais préliminaires de détermination des conditions de réaction

1. Les essais préliminaires ont pour principal objectif de déterminer les conditions de réaction donnant une cinétique de déplétion de premier ordre. Ces essais servent à établir un programme d'échantillonnage qui permette d'évaluer la déplétion du produit chimique testé (en mettant en évidence les différences significatives par rapport aux témoins négatifs) tout en préservant la capacité de quantifier la concentration du produit chimique testé dans le système jusqu'aux mesures finales. Les essais préliminaires sont réalisés sur du matériel biologique (RT-HEP cryoconservés) dont l'activité enzymatique métabolique de phases I et II a été caractérisée (cf. annexe 3).
2. Il faut disposer d'une méthode analytique dont l'exactitude, la précision et la sensibilité pour quantifier le produit chimique testé dans le milieu d'essai sont connues, ainsi que d'instructions précises pour la préparation et le stockage des échantillons. La limite analytique de quantification (Ldq) du produit chimique testé dans le milieu d'essai doit être connue.
3. Pour obtenir une vitesse de déplétion du produit chimique qui puisse être utilisée dans le modèle d'extrapolation *in vitro-in vivo*, il est généralement souhaitable de parvenir à une déplétion du produit chimique testé de 20 % à 90 % au cours de l'essai. Les variables qui peuvent être testées pour parvenir à ce résultat sont notamment la densité de cellules RT-HEP, la concentration initiale du produit chimique testé et la durée totale d'incubation (Fay et al., 2015).
4. Outre ces essais préliminaires, d'autres aspects à prendre en compte pour une mesure exacte de la déplétion du substrat sont notamment : la sensibilité de la méthode analytique et le recours à un étalon interne, le choix des solvants utilisés pour dissoudre le produit chimique testé, l'introduction dans le système et l'arrêt de la réaction, ainsi que l'utilisation de témoins positifs (produit chimique de référence) et négatifs (cf. annexe 4 et [OCDE, 2018]).
5. Il est généralement recommandé de conduire les essais de déplétion du substrat, essais préliminaires compris, à des densités de $1-2.0 \times 10^6$ hépatocytes/mL.
6. La concentration du produit chimique testé ne doit pas être cytotoxique. Il convient donc d'évaluer la viabilité des RT-HEP exposés à la concentration d'essai, en utilisant par exemple le test d'exclusion au bleu de trypan. La viabilité des RT-HEP doit être ≥ 80 %.
7. La concentration initiale de produit chimique testé est déterminée par la nécessité de parvenir à une cinétique de premier ordre, ainsi que par la sensibilité de la méthode analytique, sachant qu'il peut être nécessaire de mesurer des concentrations nettement plus basses que les valeurs initiales (à des points dans le temps ultérieurs). La sensibilité de la méthode analytique doit garantir l'exactitude des mesures pour tous les points dans le temps, ou pour 10 % de la concentration initiale du produit chimique testé. En théorie, plus la concentration initiale est inférieure à la constante de Michaelis-Menten, K_M , plus la probabilité d'une cinétique de premier ordre est forte. K_M est la concentration de substrat à laquelle la vitesse de réaction est de $\frac{1}{2} V_{max}$ (vitesse maximale atteinte par le système à la concentration de saturation maximale de substrat). En pratique, il n'est pas toujours possible de parvenir à ces concentrations, du fait des limites de détection de la méthode d'analyse du produit chimique testé. L'expérience montre qu'une concentration

initiale se situant dans la gamme des valeurs micromolaires les plus basses/nanomolaires les plus élevées ($\leq 1.0 \mu\text{M}$, par exemple) donne souvent des résultats satisfaisants ; cependant, les utilisateurs s'efforceront de conduire les essais de déplétion à la concentration la plus basse raisonnablement possible pour le produit chimique testé. D'autres considérations relatives aux concentrations de produit chimique figurent dans le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 - Section 3.4 (OCDE, 2018).

8. Pour choisir une concentration initiale appropriée du produit chimique testé, on peut évaluer trois concentrations : a) $1.0 \mu\text{M}$ ou une autre concentration fondée sur des données antérieures connues ; b) concentration la plus basse quantifiable, en prenant pour hypothèse une déplétion de 50 %, et c) une concentration comprise entre a) et b).

9. Il est possible de recourir à un arbre décisionnel pour le choix définitif de la concentration d'incubation initiale du produit chimique testé.



10. Les essais préliminaires sont généralement conduits sur un nombre limité de points dans le temps (0.1, 1 et 2 h, par exemple). La concentration initiale de produit chimique qui donne la vitesse de déplétion la plus élevée est habituellement retenue pour l'étude définitive. Si plusieurs concentrations du produit chimique testé donnent des vitesses de déplétion similaires, c'est la concentration la plus élevée qui est retenue pour l'étude définitive, car elle posera moins de problèmes de limite de détection.

11. Selon les besoins, le schéma d'échantillonnage peut couvrir une durée de < 10 min à 4 h en intégrant les six points dans le temps recommandés au minimum pour les prélèvements.

12. Il ne faut pas s'attendre à ce que les constantes de vitesse de déplétion de premier ordre calculées à partir de ces essais varient en proportion directe de la densité cellulaire ou de la concentration du produit chimique testé. Si les vitesses de biotransformation sont très basses, il est possible d'augmenter le temps d'incubation jusqu'à 4 h. Il n'est pas recommandé de chercher à obtenir des niveaux d'activité plus élevés en augmentant la

densité de RT-HEP au-delà de 2×10^6 cellules/mL, en raison du risque de saturation des enzymes.

13. Le maintien d'une cinétique de premier ordre peut être compromis si la concentration initiale de produit chimique sature l'activité des enzymes responsables de la clairance chimique. Pour les voies réactionnelles présentant une cinétique Michaelis-Menten classique, cette saturation se traduira par une élimination d'ordre zéro. L'apparition d'une cinétique d'ordre zéro indique que la concentration initiale de produit chimique doit être réduite (Johanning, 2012).

14. Dans certains cas, la transformation logarithmique des données peut donner un profil suggérant une cinétique bi-exponentielle, avec une phase initiale de déplétion « rapide » suivie d'une phase terminale de déplétion « lente ». Ce profil peut être dû à une inhibition liée au produit (l'accumulation de produits métaboliques inhibant l'activité enzymatique aux derniers points dans le temps), à une limite liée aux cofacteurs ou à la saturation des enzymes. Une réduction de la concentration initiale de produit chimique ainsi que de la densité cellulaire peut être tentée pour résoudre le problème (Fay et al., 2015).

References

Fay, K.A. et al. (2015), Determination of metabolic stability using cryopreserved hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Current Protocols in Toxicology* 65:4.42.1-29.

Johanning, K. et al. (2012), Assessment of metabolic stability using the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fraction, *Current Protocols in Toxicology* 53:14.10.1-28.

OECD (2018), Guidance Document on the Determination of in vitro intrinsic clearance using cryopreserved hepatocytes (RT-HEP) or liver S9 sub-cellular fractions (RT-S9) from rainbow trout and extrapolation to in vivo intrinsic clearance, Series on Testing and Assessment No. 280, OECD Publishing, Paris.

ANNEXE 7

Configurations d'essai

Configuration d'essai 1 : méthode utilisant un seul flacon (figure 1)

1. La méthode à un seul flacon est recommandée pour l'essai des produits chimiques ne présentant pas de difficulté particulière (produits non volatils, n'adhérant pas aux parois des récipients et se distribuant rapidement dans le système d'incubation, par exemple). C'est la configuration qui procure généralement les résultats les moins variables, et la plus simple à réaliser.
2. Conformément aux indications des §§ 34 et suivants du texte principal, les incubations sont réalisées dans un seul flacon contenant par exemple 1 mL de suspension de RT-HEP. Les échantillons (100 µL) sont prélevés dans ce flacon aux points dans le temps qui ont été définis, et transférés dans un tube de microcentrifugation contenant une solution d'arrêt.
3. Un minimum de 6 points dans le temps est nécessaire pour déterminer la CL, IN VITRO, INT ; la configuration d'essai doit donc inclure ≥ 6 points dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple).

Figure 1. Configuration d'essai 1 : épreuves indépendantes par la méthode à un seul flacon

1 ^{re} épreuve	RT-HEP actifs Produit chimique testé A RT-HEP enzymatiquement inactifs Produit chimique testé A RT-HEP actifs Produit chimique de référence		Sous-échantillons prélevés à chaque point dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple)
2 ^e épreuve	RT-HEP actifs Produit chimique testé B RT-HEP enzymatiquement inactifs Produit chimique testé B RT-HEP actifs Produit chimique de référence		Sous-échantillons prélevés à chaque point dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple)
3 ^e épreuve (s'il y a lieu)	RT-HEP actifs Produit chimique testé C RT-HEP enzymatiquement inactifs Produit chimique testé C RT-HEP actifs Produit chimique de référence		Sous-échantillons prélevés à chaque point dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple)

Configuration d'essai 2 : méthode utilisant plusieurs flacons (figure 2)




4. Cette configuration, qui comporte des incubations dans des flacons individuels, est recommandée pour les produits chimiques d'essai volatils ou très hydrophobes.
5. Les incubations avec des substances d'essai volatiles peuvent être réalisées dans des flacons pour GC contenant par exemple 200 µL de suspension de RT-HEP, fermés par un bouchon doublé d'un septum, après la période de pré-incubation. Une seringue peut alors être utilisée pour introduire d'une part le produit chimique testé et d'autre part

la solution d'arrêt. Il est également possible de fermer les flacons juste après l'ajout du produit chimique au moyen d'une pipette, et de les ouvrir juste avant l'ajout de la solution d'arrêt.

6. Des flacons à insert en verre Hirschmann peuvent être utilisés pour les produits chimiques très hydrophobes.

7. Comme dans la méthode à un seul flacon, chaque essai comporte au minimum deux épreuves indépendantes de détermination de la CL, IN VITRO, INT. Les épreuves indépendantes se déroulent des jours distincts, ou le même jour à condition que pour chaque épreuve : a) les solutions du produit chimique testé (solutions-mères et solutions de travail fraîches) soient préparées indépendamment et b) les RT-HEP utilisés soient décongelés indépendamment. À chaque épreuve, le nombre préétabli de flacons est préparé pour les RT-HEP actifs (14 par exemple au total, 7 pour le produit chimique testé et 7 pour le produit chimique de référence) et pour les RT-HEP inactifs (7, par exemple). Le produit chimique testé et le produit chimique de référence sont introduits dans les flacons selon le schéma de la figure 2. La solution d'arrêt est ajoutée directement à chaque flacon aux différents points dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple). Pour plus de précisions, on se reportera à Fay et al., 2015.

Figure 2. Configuration d'essai 2 : épreuves indépendantes par la méthode à flacons multiples

1 ^{re} épreuve	RT-HEP actifs Produit chimique testé 2 10 20 30 60 90 120 RT-HEP enzymatiquement inactifs Produit chimique testé 2 10 20 30 60 90 120 RT-HEP actifs 2 10 20 30 60 90 120 Produit chimique de référence	 Solution d'arrêt ajoutée directement à chaque flacon aux différents points dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple)
2 ^e épreuve	RT-HEP actifs Produit chimique testé 2 10 20 30 60 90 120 RT-HEP enzymatiquement inactifs Produit chimique testé 2 10 20 30 60 90 120 RT-HEP actifs 2 10 20 30 60 90 120 Produit chimique de référence	 Solution d'arrêt ajoutée directement à chaque flacon aux différents points dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple)
3 ^e épreuve (s'il y a lieu)	RT-HEP actifs Produit chimique testé 2 10 20 30 60 90 120 RT-HEP enzymatiquement inactifs Produit chimique testé 2 10 20 30 60 90 120 RT-HEP actifs 2 10 20 30 60 90 120 Produit chimique de référence	 Solution d'arrêt ajoutée directement à chaque flacon aux différents points dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple)

References

Fay, K.A. et al. (2015), Determination of metabolic stability using cryopreserved hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Current Protocols in Toxicology* 65:4.42.1-29.