



Section 2
Effets sur les systèmes biologiques

Ligne Directrice n° 249
Toxicité aiguë sur lignée cellulaire de
poisson – essai sur lignée cellulaire
RTgill-W1

14 juin 2021

**Lignes directrices de l'OCDE pour
les essais de produits chimiques**



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

Toxicité aiguë sur lignée cellulaire de poisson – essai sur lignée cellulaire RTgill-W11

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice (LD) décrit un essai de toxicité aiguë réalisé dans une plaque 24 puits sur une lignée cellulaire permanente établie à partir de branchies de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), appelée RTgill-W1. Après que les cellules ont été exposées pendant 24 heures au produit chimique d'essai, la viabilité cellulaire est évaluée sur un même groupe de cellules au moyen de trois indicateurs de viabilité cellulaire colorés et fluorescents. Une plaque est requise par produit chimique d'essai et par réplicat biologique. Cet essai est conçu pour (i) prédire la toxicité aiguë chez le poisson dans le cadre d'une campagne d'essais d'un produit chimique, (ii) déterminer la plage des valeurs de travail et effectuer un pré-criblage avant un essai complet de toxicité aiguë chez le poisson ou tout autre essai de toxicité chez le poisson, (iii) produire des informations sur la toxicité exploitables aux fins de l'évaluation des dangers en association avec d'autres formes de preuves (p. ex., QSAR, analyse de la force probante des données) dans le cadre d'une stratégie d'essai intégrée (ITS)/approche intégrée en matière d'essai et d'évaluation (IATA).

2. La lignée cellulaire et l'essai sont robustes et transférables à des laboratoires ne jouissant pas d'une expérience spécifique avec la lignée cellulaire RTgill-W1 ou avec l'essai [2]. Plusieurs études ont démontré la fiabilité et la reproductibilité de la méthode, et la mise à l'essai de produits chimiques organiques recouvrant une large gamme de propriétés physico-chimiques, de mécanismes d'action et de puissances toxiques a permis de démontrer son pouvoir de prédiction de la toxicité aiguë chez le poisson [3, 4]. De plus amples indications techniques figurent dans le rapport de validation associé à l'essai [1]. De plus, la norme ISO 21115 décrit un essai comparable applicable à la qualité de l'eau [5].

3. La lignée cellulaire RTgill-W1 a été choisie à dessein pour cet essai (RV – 3.2.). Elle a été établie à partir des filaments branchiaux d'une truite arc-en-ciel en bonne santé [6], une des espèces recommandées dans la LD 203 de l'OCDE [7]. Fait important, elle supporte une exposition de plusieurs jours dans un milieu tamponné défini exempt de tout élément protéique ou animal, à savoir le milieu d'exposition L-15/ex.

4. Les définitions utilisées dans cette Ligne directrice sont présentées à l'annexe 1.

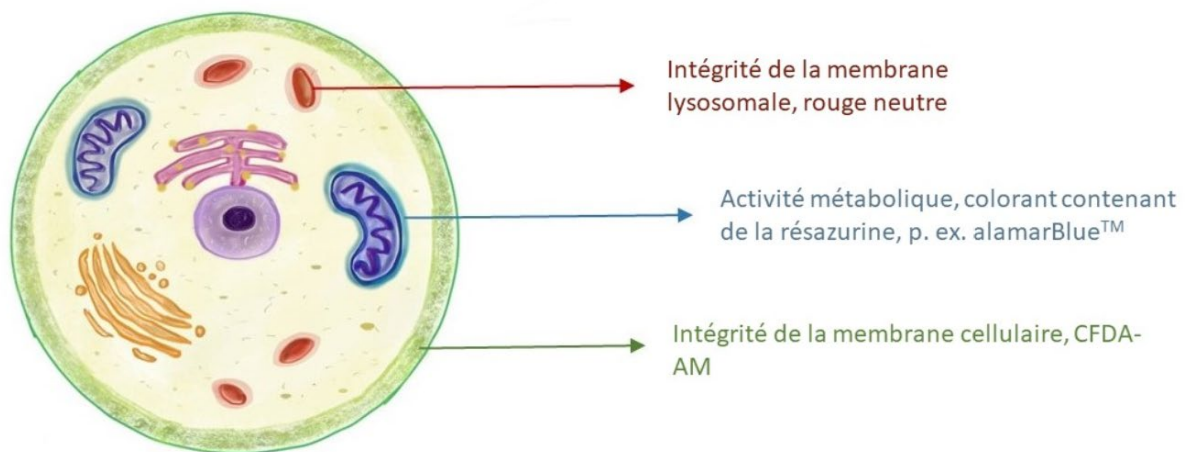
PRINCIPE DE L'ESSAI

5. L'essai consiste à exposer des cellules RTgill-W1 en monocouche confluyente dans des plaques 24 puits à un produit chimique d'essai pendant 24 h dans l'obscurité, dans un milieu exempt de protéines spécialement préparé (L-15/ex), puis à évaluer la viabilité cellulaire au moyen d'un ensemble d'indicateurs de viabilité cellulaire colorés et fluorescents (paragraphes 6 et 7). Il est conçu pour qu'on puisse prélever des échantillons de milieu d'exposition dans les puits au début (c_{0h}) et à la fin (c_{24h}) de l'exposition, et ainsi calculer la moyenne géométrique des concentrations de produit chimique

¹La présente Ligne directrice est accompagnée d'un rapport de validation complet (RV, [1]). Les renvois vers ce rapport sont indiqués dans la Ligne directrice par la mention « RV – N° de section ».

mesurées ([1] – 3.3.5.). Les données sont exprimées en pourcentage de la viabilité cellulaire observée dans les puits témoins, en fonction de la concentration de produit chimique d'essai. La courbe concentration-réponse établie à partir de ces données permet à son tour de déterminer la concentration efficace qui provoque une baisse de 50 % de la viabilité cellulaire, appelée CE50. On peut aussi en déduire d'autres caractéristiques telles que la concentration non toxique (par régression non linéaire [8]) ou encore la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) (par analyse de la variance).

6. Cet essai permet de déterminer la cytotoxicité sur la base de trois mesures de la viabilité cellulaire d'un même groupe de cellules. Il utilise en effet les indicateurs colorés fluorescents suivants : un colorant contenant de la résazurine, marqueur d'activité métabolique ; le diacétate de 5-carboxyfluorescéine, ester acétoxyméthyle (CFDA-AM), marqueur d'intégrité de la membrane cellulaire ; le rouge neutre, marqueur d'intégrité de la membrane lysosomale (graphique 1, [9], [1] – 3.3.7). Le principe est de mesurer le signal fluorescent des trois colorants dans le milieu, puis d'exprimer la viabilité des cellules traitées en pourcentage de la viabilité des cellules non traitées (témoins).



Graphique 1. Trois indicateurs colorés fluorescents marqueurs de trois éléments de la viabilité cellulaire

7. La résazurine pénètre dans les cellules sous sa forme non fluorescente avant d'être convertie en résorufine (le produit fluorescent) par des oxydoréductases mitochondriales, microsomaux et cytoplasmiques. Une baisse de fluorescence de la résorufine indique une baisse d'activité métabolique des cellules, notamment une atteinte à la membrane mitochondriale [10]. Le CFDA-AM est un substrat d'estérase converti en 5-carboxyfluorescéine et retenu sous cette forme dans les cellules intactes. Une baisse de fluorescence du CFDA-AM indique donc une atteinte à l'intégrité de la membrane plasmique (membrane cellulaire). Le rouge neutre pénètre dans les cellules et s'accumule dans les lysosomes [12]. Une rupture des lysosomes provoque donc une baisse de fluorescence du rouge neutre.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

8. Domaine d'applicabilité : il a été démontré que, pour une large gamme de produits chimiques, les valeurs de CE50 obtenues avec l'essai sur lignée cellulaire RTgill-W1 présentent dans l'ensemble un excellent degré de concordance avec les concentrations létales (CL50) obtenues dans les essais de toxicité aiguë chez le poisson [2-4] ([1] – 3.5.) ; il existe néanmoins des exceptions, décrites ci-après [3] ([1] – 1.2. et 7.). Dans le cas des produits chimiques neurotoxiques qui agissent sur des canaux ioniques ou récepteurs spécifiques aux tissus cérébraux, l'essai sur lignée cellulaire RTgill-W1 est

moins sensible que les essais sur le poisson. De plus, dans le cas précis de l'alcool allylique, et bien qu'il ait été démontré que la lignée cellulaire est capable de biotransformer les produits chimiques, la sous-estimation importante de la toxicité observée avec l'essai sur lignée cellulaire par rapport aux essais sur le poisson pourrait être due au fait que la lignée RTgill-W1 ne peut pas convertir l'alcool allylique en acroléine, son métabolite beaucoup plus toxique. En revanche, la toxicité *in vivo* de l'acroléine est très bien représentée par l'essai *in vitro* sur lignée RTgill-W1. Ainsi, si des éléments indiquent qu'un métabolite du produit chimique d'essai pourrait être pertinent pour l'évaluation de sa toxicité, il est recommandé de réaliser l'essai également avec le métabolite concerné, conformément au document-guide n° 23 sur les essais de toxicité en milieu aquatique des produits chimiques difficiles [13].

9. Information sur le produit chimique d'essai : avant de procéder à l'essai, il convient de tenir compte des propriétés spécifiques connues du produit chimique, le cas échéant à une température aussi proche que possible de la température de culture cellulaire (~19 °C). Parmi les propriétés utiles figurent la formule structurale, la masse moléculaire, la pureté, l'hydrosolubilité, la pression de vapeur, le coefficient de partage n-octanol/eau K_{OE} , corrigé si nécessaire en fonction du pH (voir pK_a), la constante de Henry K_h (on notera qu'elle peut être déduite de l'hydrosolubilité et de la pression de vapeur), la constante d'acidité pK_a , utilisée pour corriger le K_{OE} des produits chimiques dépendants du pH au pH du milieu L-15/ex [7-7.5, voir l'annexe 5), ainsi que la stabilité dans l'eau et à la lumière. Il a été montré que la procédure d'essai convient pour un large éventail de valeurs des propriétés physico-chimiques, qu'il s'agisse par exemple de l'hydrosolubilité qui remplace les concentrations atteignables dans l'eau (de 10^{-3} à 10^6 mg/L), du $\log K_{OE}$ qui remplace l'hydrophobie (de -4 à +7), ou encore du $\log K_h$ qui remplace la volatilité (de 0 à -13) ([1] – 4. et 7.) Il convient de faire preuve de prudence avant de réaliser cet essai avec des produits chimiques pour lesquels les informations énumérées ci-dessus ne sont pas disponibles car, le mode opératoire dépendant des propriétés physico-chimiques du produit chimique d'essai, les résultats obtenus pourraient ne pas être significatifs ou être difficiles à interpréter. En ce qui concerne les produits chimiques peu solubles dans l'eau ou difficiles à tester, se reporter au document-guide n° 23 sur les essais de toxicité en milieu aquatique des produits chimiques difficiles [13].

10. Quantification des concentrations d'exposition : les concentrations efficaces étant déduites des concentrations de produit chimique mesurées, il convient de disposer d'une méthode analytique présentant une exactitude, des limites de détection et de quantification et une plage de travail validées. (Note : L'utilisation des concentrations nominales est possible dans des cas dûment justifiés. De plus, s'il a été vérifié que les concentrations de produit chimique mesurées se situent dans une fourchette de 20 % autour de la concentration nominale à la fin de l'exposition, cette concentration nominale peut être utilisée pour l'estimation de l'effet, conformément à d'autres lignes directrices de l'OCDE ; [1] – 3.3.5.)

11. Format des plaques et durée d'exposition : l'essai a été mis au point et validé avec une plaque 24 puits, qui fournit à la fois un bon débit et un volume de milieu suffisant pour l'analyse chimique, sans pour autant compliquer la préparation des échantillons ; mais il est également possible de le conduire avec des plaques d'un autre format, à condition d'adapter proportionnellement les volumes et le nombre de cellules de départ ([1] – 3.3.3.). De même, bien que l'essai ait été optimisé et validé pour prédire la toxicité aiguë chez le poisson après une exposition de 24 h, la durée d'exposition peut aller jusqu'à 72 h, c'est-à-dire la période de viabilité des cellules dans le milieu d'exposition L-15/ex ([1] – 3.3.6.).

12. Application du produit chimique : les cellules étant exposées en milieu aqueux (précisément, le milieu d'exposition L-15/ex), on peut appliquer le produit chimique d'essai en le dissolvant directement dans ce milieu. Pour préparer de cette manière des produits chimiques difficiles à tester, consulter le document-guide n°23 sur les essais de toxicité en milieu aquatique des produits chimiques difficiles [13]. Pour une utilisation en routine, cependant, afin de tirer parti des faibles volumes de produit chimique nécessaires dans l'essai, de réduire les pertes dues aux manipulations répétées et de limiter le risque de contamination microbienne (par exemple, par agitation prolongée), il est possible d'utiliser un solvant organique (diméthylsulfoxyde (DMSO), méthanol ou éthanol, par exemple). Ces solvants

sont connus pour leur absence de cytotoxicité aiguë jusqu'à une concentration d'au moins 1 % (v/v) ; pour autant, il est recommandé d'employer une concentration inférieure ou égale à 0.5 % (v/v) (voir [1] – 3.3.2. et 3.3.8.2. pour plus de précisions).

13. Interférence des produits chimiques d'essai avec les indicateurs colorés fluorescents : certains produits chimiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou les colorants pour textiles présentent une fluorescence intrinsèque (autofluorescence) qui peut causer une interférence avec le signal d'un ou de plusieurs indicateurs colorés fluorescents. Dans chaque plaque 24 puits, il convient donc de réserver deux puits témoins sans cellules pour détecter et quantifier ces interférences. Si une interférence est détectée avec un produit chimique d'essai, il faudra alors réaliser une épreuve supplémentaire avec toutes les dilutions de ce produit chimique dans une plaque témoin de référence, c'est-à-dire une plaque traitée comme une plaque d'exposition, mais entièrement sans cellules. Il semble que de telles interférences se présentent rarement ([1] – 3.3.8.1.). Consulter les spectres d'absorption et d'émission disponibles pour vérifier le risque d'une interférence.

14. Réplicats : chaque concentration du produit chimique d'essai et chaque témoin solvant sont testés dans trois puits indépendants contenant des cellules issues du même passage (autrement dit, obtenues après le même nombre de repiquages). Ces puits indépendants sont des réplicats techniques. Si des réplicats biologiques sont nécessaires, il est possible de réaliser des épreuves indépendantes avec des cellules issues de passages différents (nombre de repiquages différents). En général, une seule épreuve suffit par produit chimique d'essai si la concentration efficace du produit chimique est comprise dans la plage des concentrations testées (choisie à l'aide d'un essai de détermination de la plage de travail) et si la variabilité entre réplicats techniques est acceptable, c.-à-d. si l'écart-type entre les trois ne dépasse pas 20 % à au moins deux concentrations consécutives ([1] – 3.3.9.).

15. Essai de mélanges et d'UVCB : la méthode décrite dans la présente Ligne directrice convient aux mélanges aqueux de composition connue ou inconnue. De fait, la validation de cette Ligne directrice a permis de démontrer son applicabilité à des échantillons d'eau (eaux de surface ou différents types d'effluents) moyennant de légères modifications dans la préparation des échantillons [5]. Ces modifications consistent notamment à mettre en place une stratégie d'identification des effets de matrice potentiels, c'est-à-dire de tester la réponse à un témoin positif enrichi et de déterminer s'il y a formation de précipités. Si le produit chimique d'essai fait partie des substances de composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou matériels biologiques (UVCB), ou s'il s'agit d'une substance multi-constituant, il convient, dans la mesure du possible, d'en caractériser la composition, en déterminant par exemple l'identité chimique, la teneur et les propriétés physico-chimiques des constituants (paragraphe 9). Le document-guide n° 23 sur les essais de toxicité en milieu aquatique des produits chimiques difficiles [13] contient des recommandations relatives aux essais de produits chimiques difficiles comme les mélanges, les UVCB ou les substances multi-constituants. Toutefois, avant de mener l'essai sur un mélange, sur des produits chimiques difficiles à tester (parce qu'instables par exemple) ou sur des produits chimiques à la limite du domaine d'applicabilité décrit dans cette LD, il convient d'examiner d'emblée si les résultats générés par l'essai seront scientifiquement significatifs.

DÉMONSTRATION DES COMPÉTENCES (TÉMOIN POSITIF)

16. Avant d'appliquer en routine la méthode d'essai validée et afin i) de faire la preuve de leur compétence technique à mettre en œuvre l'essai et ii) de vérifier la sensibilité/réactivité de la lignée cellulaire RTgill-W1, les laboratoires doivent appliquer la méthode à la substance utilisée comme témoin positif (ici, la 3,4-dichloroaniline, ou 3,4-DCA) de façon répétée, c'est-à-dire dans au moins trois épreuves indépendantes, et sur la plage complète de concentration-réponse. La plage acceptable de valeurs de CE50 avec la 3,4-DCA pour chaque indicateur coloré fluorescent est donnée au paragraphe 17.

CRITÈRES DE VALIDITÉ DE L'ESSAI

17. Pour que les résultats de l'essai soient valides, les critères suivants doivent être remplis ([1] – 3.3.8.).

a. Exclusion de l'autofluorescence : puits témoins sans cellules

L'écart entre les valeurs brutes de la fluorescence dans les deux puits témoins sans cellules (le premier contenant du L-15/ex, l'autre contenant du L-15/ex plus le produit chimique d'essai à sa concentration la plus forte) ne doit pas dépasser 20 %.

b. Exclusion de toute contamination du témoin solvant organique

Si un solvant organique tel que le DMSO (paragraphe 12) est utilisé pour diluer le produit chimique d'essai, l'éventuelle baisse de viabilité cellulaire dans le témoin solvant ne doit pas dépasser 10 % de la viabilité observée dans le témoin négatif, c'est-à-dire que l'écart éventuel doit se situer dans les limites de la variabilité naturelle.

c. Performance de l'essai : plaque de contrôle qualité avec le témoin positif 3,4-DCA

Les valeurs moyennes de CE50 du témoin positif 3,4-DCA sont fondées sur les concentrations nominales (sans détermination analytique de la concentration d'exposition) ; elles doivent être comprises dans une fourchette de 2.5 écarts-types (ET) autour des valeurs de CE50 ci-dessous :

- CE50_{3,4-DCA} Résazurine : 43.6 mg/L ± 6.1 mg/L (2.5 ET = de 28.4 mg/L à 58.9 mg/L)
- CE50_{3,4-DCA} CFDA-AM : 62.5 mg/L ± 18.9 mg/L (2.5 ET = de 15.3 mg/L à 109.8 mg/L)
- CE50_{3,4-DCA} Rouge neutre : 58.6 mg/L ± 18.6 mg/L (2.5 ET = de 12.1 mg/L à 105.0 mg/L)

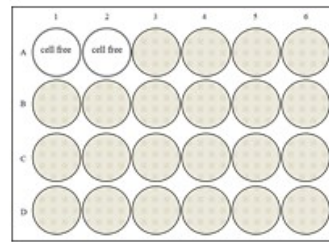
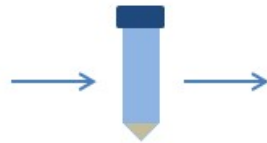
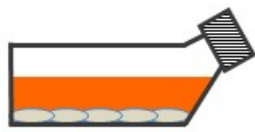
DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

18. Une liste de l'appareillage et du matériel nécessaires figure à l'annexe 2. Les réactifs requis et les protocoles de préparation des milieux et des solutions sont présentés à l'annexe 3. Un exemple de mode opératoire normalisé pour la réalisation de l'essai est disponible à l'annexe 4. Des modèles de rapport d'essai sont fournis à l'annexe 5. Enfin, l'enchaînement des étapes de la méthode, jour après jour, est synthétisé dans le graphique 2.

Lignée cellulaire

19. La lignée cellulaire RTgill-W1 est disponible dans le commerce chez ATCC® (marque déposée : CRL-2523™). Après 150 repiquages (ou « passages ») dans le laboratoire, les cellules doivent être éliminées et de nouvelles cellules ayant subi moins de repiquages doivent être décongelées. On trouvera à l'annexe 6 une description détaillée de la culture cellulaire de routine en conditions stériles et des opérations de congélation/décongélation, avec la liste de l'appareillage et du matériel, des réactifs, des milieux et des solutions, ainsi que les formulaires de documentation correspondants. Se référer au document-guide sur les bonnes pratiques applicables aux méthodes *in vitro* (GIVIMP) pour les considérations générales en matière de culture cellulaire [14] ([1] – 3.7.2.).

1er jour
Ensemencement



350 000 cellules par puits dans 1 mL sauf pour A1 et A2

2e jour
Exposition des cellules et prise d'échantillons

a) Préparation de la solution d'exposition dans un solvant organique

Dilution en série dans le solvant organique

1: x 1: x 1: x 1: x 1: x

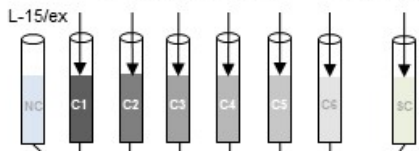


Étape 1

Préparation de la solution mère de produit chimique

Dilution 1:200 dans le L-15/ex
12 mL L-15/ex + 60 µL solution mère correspondante

solvant organique 1:200 dans le L-15/ex



Étape 2

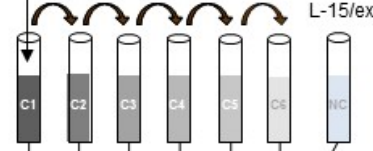
Préparation des solutions d'exposition

b) Préparation de la solution d'exposition par dilution directe du produit chimique d'essai dans le milieu d'exposition



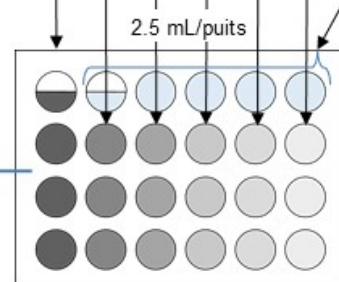
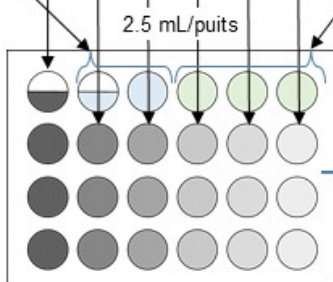
Dilution en série dans le L-15/ex

1: x 1: x 1: x 1: x 1: x

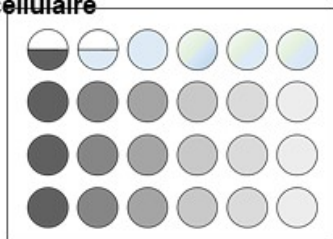


Étape 3

Exposition des cellules et prise d'échantillons
Échantillons 500 µL par puits et par flaçon



3e jour
Prise d'échantillons et mesure de la viabilité cellulaire

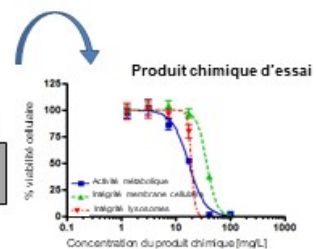


Prise d'échantillons en fin d'exposition

Échantillons 500 µL par puits et par flaçon



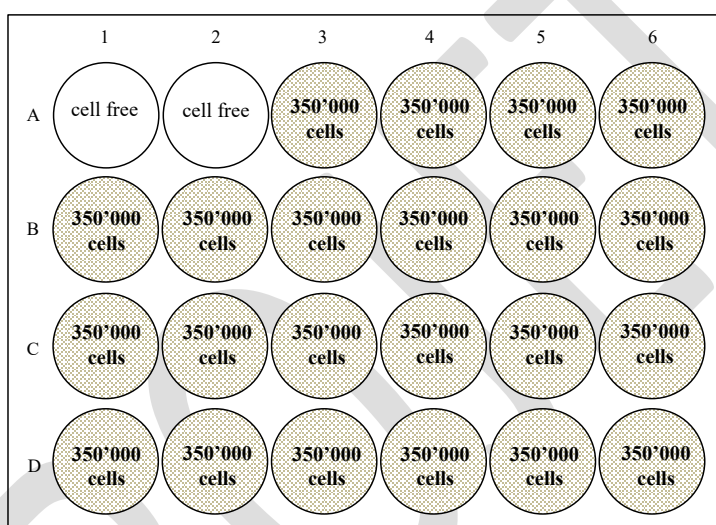
Mesure de la viabilité cellulaire



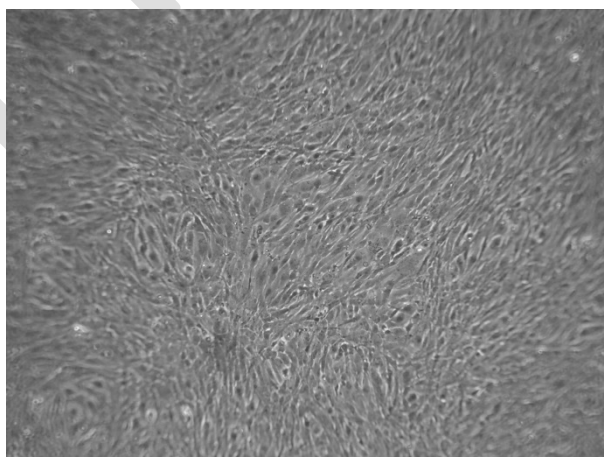
Graphique 2 – Aperçu général de la procédure d'essai. S1 à S6 désignent les solutions mères du produit chimique d'essai utilisées dans la préparation des solutions d'exposition de concentrations finales C1 à C6, S1 et C1 étant respectivement les concentrations les plus élevées. Pour plus d'informations sur la manipulation des produits chimiques d'essai, voir le graphique 5.

Ensemencement des cellules dans une plaque 24 puits (graphique 2, 1^{er} jour)

20. L'essai nécessite une plaque 24 puits par réplicat biologique d'un produit chimique. Chaque jour de l'essai, préparer une plaque supplémentaire distincte pour le témoin positif (3,4-DCA). Après la récolte des cellules de RTgill-W1 dans le flacon de culture cellulaire, qui devrait donner environ 10 millions de cellules (consulter l'annexe 4 pour plus de détails), ensemercer 350 000 cellules dans 1 mL de milieu de culture L-15 complet par puits d'une plaque 24 puits, sauf dans les puits témoins sans cellules (puits A1 et A2, voir plan d'ensemencement du graphique 3). Pendant l'ensemencement, veiller à l'homogénéité de la suspension cellulaire, afin d'éviter la formation d'amas. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, les cellules devraient avoir formé dans chaque puits une monocouche confluyente visible au microscope (graphique 4). Si la confluence n'est toujours pas atteinte au bout de 24 h, incuber à nouveau la plaque pendant 24 à 48 h avant d'exposer les cellules au produit chimique d'essai.



Graphique 3 — Plan d'ensemencement dans les plaques de culture 24 puits (volume d'ensemencement 1 mL par puits)



Graphique 4 — Monocouche confluyente de cellules RTgill-W1

Exposition des cellules à un produit chimique d'essai (graphique 2, 2^e jour)

Choix des six concentrations d'essai

21. Dans l'idéal, à la plus forte concentration d'essai (puits B1, C1 et D1, graphique 5) on devrait observer une viabilité cellulaire de 0 % de la viabilité observée dans les puits du témoin négatif et du témoin solvant (puits A3 à A6, graphique 5). À l'inverse, la plus faible concentration d'essai (puits B6, C6 et D6, graphique 5) ne devrait avoir aucun effet donc donner une viabilité cellulaire de 100 % de la viabilité observée dans les puits du témoin négatif et du témoin solvant. Procéder à un essai de détermination de la plage de travail avant l'essai définitif permettra de sélectionner la plage de concentrations appropriée. L'essai de détermination de la plage de travail se déroule comme l'essai définitif (voir ci-dessous), mais il faut partir de l'hydrosolubilité et procéder à des dilutions successives de facteur 10. Pour orienter le choix de l'ordre de grandeur des concentrations d'essai autour de la toxicité la plus faible attendue (niveau de référence), il est possible de combiner ce critère d'hydrosolubilité à la prédiction de CE50 fournie par la relation quantitative structure-activité (QSAR) suivante [3] :

$$\log\text{CE50 (mM)} = -0.96 (\pm 0.09) \log K_{\text{OE}} + 1.57 (\pm 0.28) \quad (1)$$

Préparation des solutions mères du témoin positif et du produit chimique d'essai (graphique 2, étape 1)

22. Le témoin positif suggéré est la 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) dissoute dans le solvant organique diméthylsulfoxyde (DMSO). Quand un produit chimique est préparé dans le DMSO, les solutions mères correspondantes doivent être 200 fois plus concentrées que les concentrations finales d'exposition, afin d'obtenir une fraction volumique finale (qui ne génère aucune cytotoxicité aiguë) de 0.5 % de DMSO dans le milieu d'exposition. Dans le cas de la 3,4-DCA, la plus forte concentration d'exposition dans les puits est de 100 mg/L, donc il faut préparer une solution mère de 20 g/L dans le DMSO. Cette solution mère sert de point de départ à une série de dilutions dans le DMSO tel qu'illustré à l'étape 1 du graphique 2. Ces dilutions en série, d'un facteur 2 constant, permettent d'obtenir six concentrations de solution mère de 3,4-DCA, donc six concentrations d'exposition de 100, 50, 25, 12.5, 6.25 et 3.13 mg/L dans les puits. Ces concentrations ont été définies de manière à obtenir une courbe concentration-réponse complète dans le milieu d'exposition (L-15/ex), autrement dit une viabilité cellulaire minimale de 0 % (de la viabilité observée dans le témoin solvant) à la concentration la plus élevée et, de façon analogue, une viabilité cellulaire maximale de 100 % à la concentration la plus faible (graphique 5A). Il convient de préparer une série de dilutions fraîche de 3,4-DCA chaque jour de l'essai.

23. Pour préparer les solutions mères de produit chimique d'essai dans un solvant organique (graphique 2, étape 1), suivre la même procédure que pour la préparation du témoin positif afin d'obtenir six concentrations de produit chimique d'essai par une série de dilutions d'un facteur constant ne dépassant pas 2.5. Pour préparer les solutions mères de produit chimique d'essai sans solvant organique, dissoudre directement le produit chimique d'essai dans le L-15/ex en conditions stériles afin d'obtenir soit la plus forte concentration d'essai, soit une concentration encore plus forte.

24. Après les solutions mères, il faut également préparer le matériel pour le témoin négatif (cellules exposées au L-15/ex seul) et pour le témoin solvant (cellules exposées au solvant organique seul dans le L-15/ex) (graphique 2, étape 2).

Préparation des solutions d'exposition dans le milieu L-15/ex (graphique 2, étape 2)

25. Pour préparer les solutions d'exposition, diluer les solutions mères de produit chimique d'essai (préparées dans le L-15/ex ou dans un solvant organique, paragraphe 22) dans le milieu d'exposition L-15/ex en conditions stériles (graphique 2, étape 2). Si un solvant organique a été utilisé, diluer individuellement au 1:200 les solutions mères déjà diluées en série. Si le solvant est le milieu L-15/ex,

diluer la solution mère en série dans le L-15/ex, en appliquant un facteur de dilution constant ne dépassant pas 2.5. Les solutions d'exposition doivent être préparées fraîches immédiatement avant l'exposition des cellules.

Préparation des flacons d'échantillonnage du milieu d'exposition pour la quantification du produit chimique

26. Afin de quantifier les concentrations d'exposition, prélever des échantillons de milieu d'exposition au début (c_{0h}) et à la fin (c_{24h}) de la période d'exposition des cellules, mesurer les concentrations de produit chimique d'essai, puis calculer la moyenne géométrique des concentrations d'exposition mesurées (paragraphe 35). Dans des cas exceptionnels, à savoir si des éléments indiquent fortement que le produit chimique d'essai est instable et disparaît en quatre heures ou moins, l'exposition peut être réduite à 4 h, auquel cas il convient de prélever l'échantillon de fin d'exposition au bout de 4 h (c_{4h}) et d'évaluer la viabilité cellulaire immédiatement après.

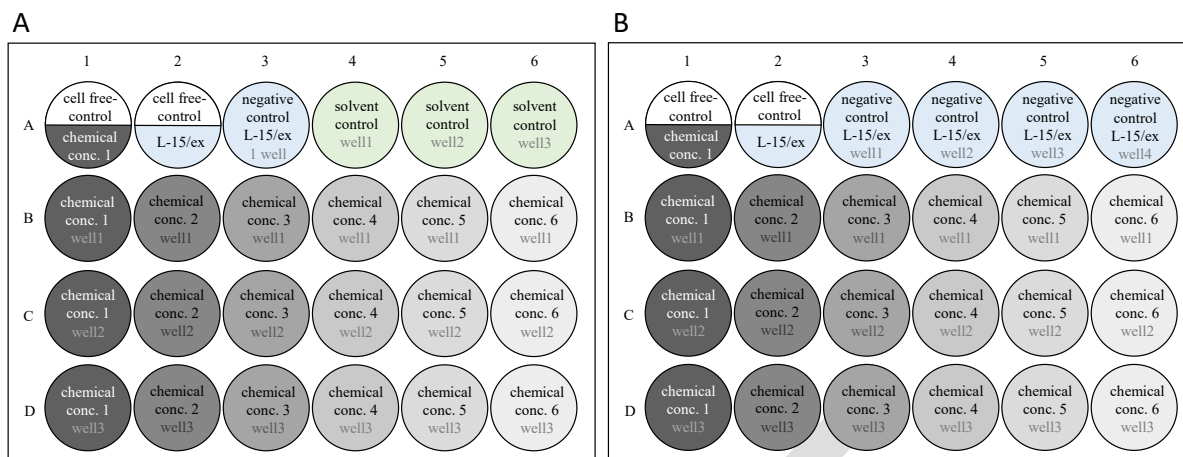
27. Avant de prélever des échantillons de milieu d'exposition en début (c_{0h}) ou en fin d'exposition (c_{24h}), préparer autant de flacons d'échantillonnage que de puits. Les flacons peuvent être pré-remplis avec un solvant, suivant le protocole analytique choisi. Il convient de prélever un échantillon de chacun des trois réplicats de chaque concentration. Il est possible de commencer par analyser deux des réplicats en mettant de côté le troisième, qui ne sera utilisé qu'en cas de circonstances spéciales (p. ex., panne d'un instrument d'analyse ou valeurs trop discordantes entre les deux premiers réplicats). Il est également possible d'analyser les trois réplicats directement.

Exposition au produit chimique d'essai et prélèvement d'échantillons pour analyse chimique au début de l'exposition (c_{0h}) (graphique 2, étape 3)

28. L'exposition des cellules au produit chimique d'essai et le prélèvement d'échantillons de milieu d'exposition contenant le produit chimique d'essai (à des fins de quantification des concentrations d'essai) doivent avoir lieu en conditions stériles.

29. Les cellules devraient avoir formé une monocouche confluyente dans chaque puits 24 h après l'ensemencement. Seules les cellules formant une monocouche peuvent être utilisées dans l'essai (paragraphe 19 et graphique 4) ([1] – 3.3.1.). Les monocouches sont visibles au microscope.

30. Enlever le milieu de culture L-15 complet des puits et rincer délicatement tous les puits avec 1 mL de milieu d'exposition (L-15/ex) en veillant à ne pas perturber la monocouche cellulaire. Enlever le L-15/ex et ajouter 2.5 mL du milieu prévu dans chaque puits (graphique 5) : dans le puits A1, déposer délicatement la solution d'exposition contenant la concentration la plus forte de produit chimique d'essai ; dans les puits A2 et A3, ajouter du L-15/ex seul ; du puits A4 jusqu'au puits D6, ajouter les solutions d'exposition (préparées comme indiqué au paragraphe 25) dans chacun des puits tripliqués par concentration, en veillant à ne pas perturber la monocouche cellulaire. Immédiatement après le début de l'exposition, transférer un échantillon de 500 μ L de chacun des trois réplicats de chaque concentration d'essai, ainsi que des témoins, dans les flacons pré-étiquetés correspondants (paragraphe 27). Couvrir la plaque avec un film adhésif ou un autre dispositif de protection (voir [1] – 3.3.4.), refermer le couvercle, et incuber pendant 24 h à 19 ± 1 °C dans l'obscurité et en conditions atmosphériques ambiantes.



graphique 5 — Plan de plaque pour un produit chimique d'essai (un produit chimique d'essai, six concentrations d'essai, trois réplicats techniques par concentration, « conc.1 » étant la plus forte concentration d'essai) À gauche (A), plan de plaque pour un produit chimique d'essai dont les solutions d'exposition sont préparées dans un solvant organique. À droite (B), plan de plaque pour un produit chimique d'essai dont les solutions d'exposition sont préparées dans le milieu d'exposition L-15/ex, sans solvant organique.

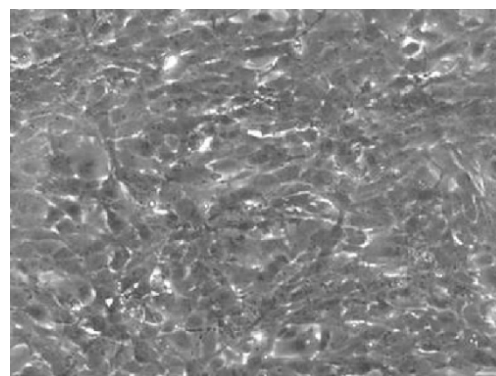
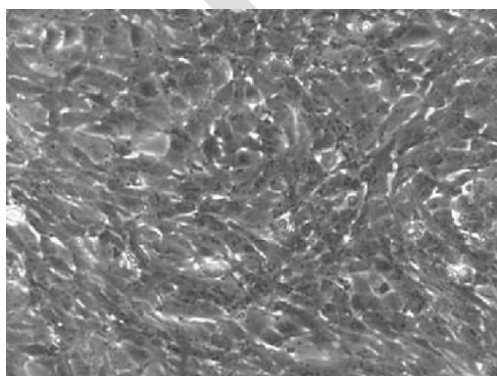
Détermination de la viabilité cellulaire

Préparation du matériel et des solutions de travail

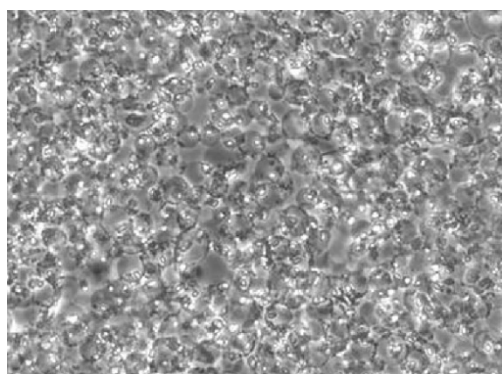
31. Préparer les solutions de travail de résazurine/CFDA-AM et de rouge neutre (annexes 3 à 5)
32. Préparer les flacons d'échantillonnage pour l'analyse chimique (C_{24h}) tel qu'expliqué au paragraphe 27.

Inspection visuelle de lésions cellulaires

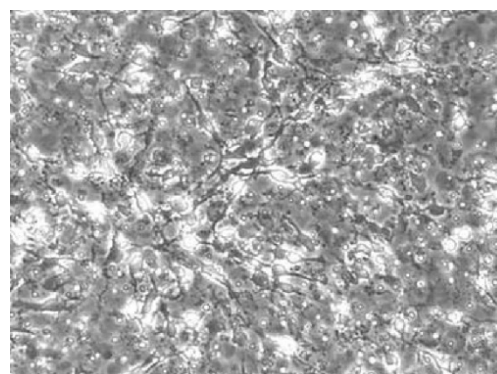
33. La première vérification de la performance de l'essai consiste à observer visuellement les cellules dans la plaque en prêtant une attention particulière au degré de leurs lésions éventuelles. Pour mieux effectuer ce contrôle visuel, il est conseillé de commencer par décoller le film adhésif, enlever le produit chimique d'essai de la plaque, puis ajouter 1 mL de tampon phosphate (PBS) par puits (paragraphe 33). Cela facilitera l'observation des cellules. Le graphique 6 montre des cellules ayant subi différents degrés de lésions après exposition au témoin positif 3,4-dichloroaniline dans le milieu d'exposition L-15/ex ; ces images servent de guide pour assurer une performance optimale de l'essai.



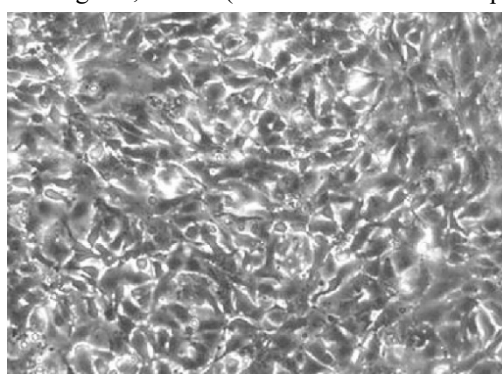
b) témoin solvant (100 % d'activité métabolique)



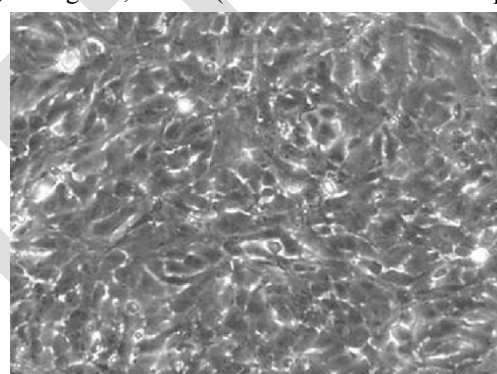
c) 100 mg/L 3,4-DCA (2 % d'activité métabolique)



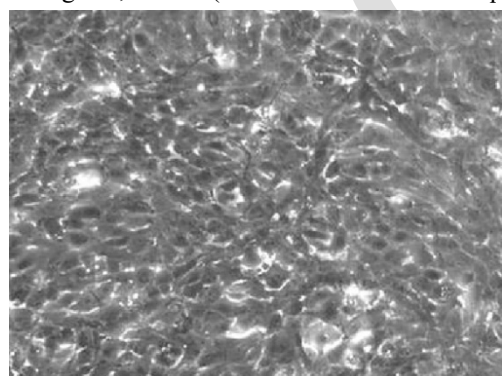
d) 50 mg/L 3,4-DCA (12 % d'activité métabolique)



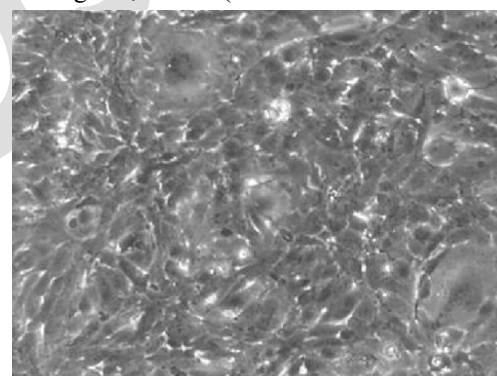
e) 25 mg/L 3,4-DCA (64 % d'activité métabolique)



f) 12.5 mg/L 3,4-DCA (81 % d'activité métabolique)



g) 6.25 mg/L 3,4-DCA (91 % d'activité métabolique)



h) 3.13 mg/L 3,4-DCA (96 % d'activité métabolique)

Note : L'activité métabolique indiquée est exprimée en pourcentage de l'activité métabolique dans le témoin, telle que mesurée avec la préparation de résazurine prête à l'emploi alamarBlue™.

graphique 6 — Images de cellules RTgill-W1 avec différents degrés de lésions après 24 h d'exposition au témoin positif 3,4-dichloroaniline

Mesure de la viabilité cellulaire et prélèvement d'échantillons pour analyse chimique à la fin de l'exposition (c_{24h}), 24 h après le début de l'exposition (graphique 2, 3^e jour)

34. Pour commencer, transférer 500 µL de milieu d'exposition de chaque puits dans les flacons d'échantillonnage correspondants en vue d'une analyse chimique (paragraphe 26, 27). Éliminer de la plaque le reste de la solution d'exposition et rincer délicatement chaque puits avec 1 mL de PBS, en veillant à ne pas endommager la couche de cellules. Dans chaque puits, remplacer la solution de rinçage par 400 µL de solution de travail de résazurine/CFDA-AM. Après 30 minutes d'incubation à

19 ± 1 °C dans l'obscurité, mesurer d'abord la fluorescence du colorant contenant de la résazurine (excitation : 530 nm, émission : 595 nm), puis la fluorescence du CFDA-AM (excitation : 493 nm, émission : 541 nm) dans un lecteur de plaques en fluorescence ; ces fluorescences mesurées sont des valeurs brutes exprimées en unités arbitraires. Éliminer la solution de travail de résazurine/CFDA-AM et ajouter 400 µL par puits de solution de travail de rouge neutre. Incuber pendant 60 minutes à 19 ± 1 °C dans l'obscurité, puis éliminer la solution de travail de rouge neutre et rincer chaque puits avec 400 µL de solution de fixation. Puis, éliminer la solution de fixation et ajouter 400 µL de solution d'extraction par puits. Incuber la plaque pendant 10 minutes tout en agitant légèrement sur un agitateur de plaques à température ambiante, puis mesurer la fluorescence (valeur brute exprimée en unités arbitraires) du rouge neutre (excitation : 530 nm, émission : 645 nm) dans un lecteur de plaques en fluorescence. Pour plus de détails, consulter les annexes 3 à 5.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des données

35. Les valeurs brutes (exprimées en unités arbitraires) de la fluorescence sont utilisées pour calculer la toxicité, exprimée en pourcentage de la viabilité cellulaire du témoin correspondant (voir ci-dessous). Si le produit chimique d'essai a été dissout dans un solvant organique comme le DMSO, le témoin correspondant est le témoin solvant (solvant organique). Si le produit chimique d'essai a été dissout dans le L-15/ex sans solvant organique, le témoin correspondant est le témoin négatif, c.-à-d. le milieu d'exposition (graphique 5).

- a) Calculer la moyenne des valeurs de fluorescence des puits témoins sans cellules, puis soustraire cette moyenne aux valeurs de fluorescence de chaque autre puits (avec cellules) de la même plaque (paragraphe 13 et 17a).
- b) Calculer, pour chaque puits tripliqué de chaque concentration de produit chimique d'essai, le pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au témoin correspondant. Ainsi, la moyenne des valeurs de fluorescence du témoin vaut 100 % (100 % des cellules sont viables) et la viabilité cellulaire correspondante de chaque autre puits s'obtient par la formule suivante (2) :

$$\% \text{ viabilité cellulaire} = \frac{\text{unités fluo. produit chimique} \times 100 \%}{\text{unités fluo. témoin correspondant}} \quad (2)$$

- c) Calculer la moyenne et l'écart-type du pourcentage de viabilité cellulaire pour chaque concentration de produit chimique d'essai et utiliser ce pourcentage de viabilité cellulaire pour interpréter la courbe concentration-réponse.

Analyse des données / Évaluation des résultats d'essai

36. La moyenne des concentrations de produit chimique mesurées (voir paragraphe 25) est utilisée comme concentration d'exposition commune aux trois puits répliqués à la concentration d'essai correspondante. Si nécessaire, l'information tirée du puits A1 (graphique 5) peut servir d'indicateur de perte abiotique (sans cellules) de produit chimique. Pour les puits contenant des cellules, si un produit chimique subit une perte telle qu'il n'est plus détectable à la fin de la période d'exposition, la valeur c_{24h} retenue sera la moitié de la limite de quantification, conformément au document-guide n° 23 sur les essais de toxicité en milieu aquatique des produits chimiques difficiles [13]. Placer en abscisses les moyennes géométriques des concentrations mesurées. (Pour rappel, pour chaque concentration

d'essai, on a calculé la moyenne géométrique des concentrations mesurées au début (C_{0h}) et à la fin (C_{24h}) de l'essai.) En ordonnées, représenter les pourcentages de viabilité cellulaire.

37. À l'aide de méthodes statistiques appropriées [15, 16], procéder à un ajustement de la courbe sigmoïde de concentration-réponse par régression non linéaire avec des contraintes paramétrées sur Bas (0.0) et Haut (100.0), puis en déduire les valeurs de CE50.

38. D'autres paramètres d'effet peuvent être déduits de la courbe concentration-réponse, par exemple les concentrations non toxiques [8] ou encore la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et la concentration sans effet observé (CSEO) ([1] – 3.4.).

39. Si l'objectif est de prédire, sur la base des données de viabilité cellulaire, la concentration létale (CL) d'exposition aiguë au produit chimique chez le poisson, il convient de relever toutes les valeurs de CE50, puis de retenir la valeur la plus basse comme estimation la plus prudente ([1] – 3.3.7.). Cette valeur de CE50 est alors considérée comme la CL50 à 96 h chez le poisson ([1] – 3.5.).

Rapport d'essai

40. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes. Un modèle de rapport d'essai est présenté à l'annexe 7.

Produit chimique d'essai

- Substance mono-constituant
 - identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, masse moléculaire et/ou autres identifiants, par exemple numéro de série/lot ou date d'expiration ;
 - apparence physique, hydrosolubilité, solubilité dans le solvant organique utilisé (le cas échéant) pour la réalisation de l'essai, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques telles que K_{OE} et constante de Henry, selon les données disponibles ;
 - informations sur la solubilité/l'insolubilité ou sur la possibilité d'obtenir une dispersion stable dans le milieu d'exposition ;
 - pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent ;
 - traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
 - concentration(s) d'essai ;
 - conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.
- Substance multi-constituant, UVCB ou mélange
 - caractérisation dans la mesure du possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la pureté, la teneur et les propriétés physico-chimiques pertinentes des constituants (voir ci-dessus), selon les données disponibles ;
 - masse moléculaire ou masse moléculaire apparente dans le cas de mélanges/polymères de composition connue ou autres informations pertinentes pour la conduite de l'étude ;
 - informations sur la solubilité/l'insolubilité ou sur la possibilité d'obtenir une dispersion stable dans le milieu d'exposition ;
 - traitement avant essai, s'il y a lieu (chauffage, broyage, par exemple) ;
 - concentration(s) d'essai ;
 - conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles.

Témoins

- Témoin sans cellules
 - différence de fluorescence dans les puits témoins sans cellules A1 et A2 pour chaque indicateur de viabilité cellulaire coloré (paragraphe 13 et 17a).
- Témoin solvant/négatif
 - identification chimique : désignation(s) IUPAC ou CAS, numéro(s) CAS et/ou autres identifiants ;
 - fournisseur, numéro de commande, numéro de lot ;
 - pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc. ;
 - apparence physique, masse moléculaire et autres propriétés physico-chimiques pertinentes, selon les données disponibles ;
 - conditions de stockage et stabilité, selon les données disponibles ;
 - justification du choix du solvant organique, concentration finale de solvant dans le milieu d'exposition et pourcentage de différence entre le témoin solvant et le témoin négatif (paragraphe 12 et 17b).
- Témoin positif e.g. 3,4-dichloroaniline (DCA)
 - fournisseur, numéro de commande, numéro de lot ;
 - pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent ;
 - concentration(s) d'essai ;
 - valeurs de CE50 obtenues pour chaque indicateur coloré de viabilité cellulaire (paragraphe 17c).

Conditions de la méthode d'essai

- Nom et adresse de l'installation d'essai et du directeur de l'étude.
- Lignée cellulaire utilisée (établissement d'où proviennent les cellules, par exemple).
- Nombre de repiquages (passages) et niveau de confluence des cellules utilisées pour l'essai.
- Méthode de numération des cellules utilisée pour l'ensemencement avant l'essai, et mesures prises pour assurer une répartition homogène des cellules (paragraphe 19).
- Lecteur de plaques en fluorescence utilisé (modèle, par exemple) et paramétrage de l'instrument.
- Méthode de préparation des solutions mères et des solutions d'exposition.
- Méthode analytique utilisée pour quantifier les concentrations d'exposition, avec sa précision, ses limites de détection et de quantification et sa plage de travail.
- Justification de l'utilisation des concentrations nominales pour le calcul de la CE50, le cas échéant.
- Procédure appliquée par le laboratoire pour faire la preuve de sa compétence à mettre en œuvre la méthode d'essai (p. ex., en testant le témoin positif 3,4-dichloroaniline, paragraphe 16) ou pour démontrer la reproductibilité de l'application de la méthode d'essai au fil du temps.

Mode opératoire

- Concentrations de produit chimique d'essai, procédure d'application et durée d'exposition (si différentes des recommandations).
- Description de toutes modifications apportées au mode opératoire (voir ci-dessous).

Résultats

- Présentation sous forme de tableau des concentrations mesurées au début et à la fin de l'exposition, et des moyennes géométriques correspondantes (paragraphe 35).
- Présentation sous forme de tableau de la moyenne et de l'écart-type des pourcentages de viabilité cellulaire, par concentration d'essai (paragraphe 34).
- Description de l'évaluation de la CE50 (notamment, programme et méthode utilisés, paragraphe 36).
- Présentation sous forme de tableau des valeurs de CE50 avec intervalles de confiance à 95 % pour le produit chimique d'essai et pour le témoin positif.
- Représentation graphique des courbes concentration-réponse correspondant à chaque indicateur de viabilité cellulaire coloré.
- Description de toutes autres observations pertinentes, s'il y a lieu.

Discussion des résultats

- Discussion et interprétation des résultats obtenus.
- Toute déviation par rapport à la Ligne directrice. Les conséquences de ces déviations devraient être considérées en lien avec la fiabilité des données de l'essai et ces considérations devront être consignées dans le rapport d'essai.

PROJET

BIBLIOGRAPHIE

- [1] OCDE (2021). Validation report to support for the acceptance development of a fish cell line acute toxicity test, the RTgill-W1 cell line assay as OECD test guideline., OECD Series on Testing and Assessment, No. 334, OECD Publishing, Paris.
- [2] Fischer M, Belanger SE, Berckmans P, Bernhard MJ, Bláha L, Coman Schmid DE, Dyer SD, Haupt T, Hermens JLM, Hultman MT, Laue H, Lillicrap A, mLnáříková M, Natsch A, Novák J, Sinnige TL, Tollefsen KE, von Niederhäusern V, Witters H, Županič A, Schirmer K. (2019). Repeatability and reproducibility of the RTgill-W1 cell line assay for predicting fish acute toxicity. *Toxicological Sciences*, 169(2): 353-364. doi: 10.1093/toxsci/kfz057
- [3] Tanneberger K, Knöbel M, Busser FJ, Sinnige TL, Hermens JLM, Schirmer K. (2013). Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay. *Environmental Sciences and Technology*, 47: 1110–1119. doi.org/10.1021/es303505z
- [4] Natsch A, Laue H, Haupt T, von Niederhäusern V, Sanders G. (2018). Accurate prediction of acute fish toxicity of fragrance chemicals with the RTgill-W1 cell assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37: 931–941. doi: 10.1002/etc.4027
- [5] ISO (2019). International Standard Water quality – Determination of acute toxicity of water samples and chemicals to a fish gill cell line (RTgill-W1). ISO 21115:2019(E) International Organization for Standardization.
- [6] Bols NC, Barlian A, Chirintrejo M, Caldwell SJ, Goegan P, Lee LEJ. (1994). Development of a Cell-Line from Primary Cultures of Rainbow-Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Gills. *Journal of Fish Disease*, 17: 601-611. doi.org/10.1111/j.1365-2761.1994.tb00258.x
- [7] OECD (2019), Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, doi.org/10.1787/9789264069961-en
- [8] Stadnicka-Michalak J, Knöbel M, Županič A, Schirmer K. (2018). A validated algorithm for selecting non-toxic chemical concentrations. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, 35(1): 37-50. doi: 10.14573/altex.1701231
- [9] Schirmer K, Dixon DG, Greenberg BM and Bols NC. (1998). Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology*, 127: 129-141. doi: 10.1016/s0300-483x(98)00031-6
- [10] O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17): 5421–5426. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
- [11] Schirmer K, Chan AGJ, Greenberg BM, Dixon DG and Bols NC. (1997). Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology In Vitro*, 11: 107-119. doi.org/10.1016/S0887-2333(97)00002-7
- [12] Borenfreund E, Puerner JA. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24: 119–124. doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3
- [13] OECD (2019), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris, doi.org/10.1787/0ed2f88e-en
- [14] OECD (2018). Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP), OECD Series on Testing and Assessment, No. 286, OECD Publishing, Paris. doi.org/10.1787/9789264304796-en
- [15] ISO (2006), International Standard. Water quality – Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281.

- [16] OCDE (2006), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), OECD Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris, doi.org/10.1787/9789264085275-en

PROJET

ANNEXE 1 : DÉFINITIONS

3,4-DCA (n° CAS 95-76-1) : 3,4-dichloroaniline, produit utilisé comme témoin positif (paragraphe 17 c) dans l'évaluation de la performance de l'essai et lors de la démonstration des compétences (paragraphe 16).

alamarBlue™ : exemple de préparation d'indicateur coloré contenant de la résazurine prête à l'emploi destinée à l'évaluation de l'activité métabolique cellulaire (n° CAS de la résazurine : 550-82-3).

ATCC : American Type Culture Collection.

c_{0h} : concentration d'exposition déterminée par analyse au début de la période d'exposition.

c_{24h} : concentration d'exposition déterminée par analyse à la fin de la période d'exposition.

CE_x (concentration efficace) : concentration à laquelle un produit chimique d'essai provoque une viabilité cellulaire de x % de la viabilité observée dans le témoin négatif ou solvant après un délai d'exposition donné. La CE₅₀, par exemple, est la concentration à laquelle on observe une viabilité de 50 % de la viabilité observée dans le témoin (solvant) (paragraphe 5 et 36).

CFDA-AM (n° CAS 124412-00-6) : diacétate de 5-carboxyfluorescéine, ester acétoxyméthyle, indicateur coloré permettant de vérifier l'intégrité de la membrane cellulaire.

CL₅₀ (concentration létale 50) : concentration du produit chimique d'essai qui provoque la mort de 50 % de la population cellulaire exposée.

CMEO : concentration minimale avec effet observé (déduite d'une vérification d'hypothèse par analyse de la variance (ANOVA) ou par un test non paramétrique équivalent).

Constante de Henry (K_n) : propriété physico-chimique d'un produit chimique qui décrit sa tendance à se partager entre la phase aqueuse et la phase gazeuse.

CSEO : concentration sans effet observé (déduite d'une vérification d'hypothèse par analyse de la variance (ANOVA) ou par un test non paramétrique équivalent).

DMSO (n° CAS 67-68-5) : diméthylsulfoxyde.

ET : écart-type.

Évaluation de la viabilité cellulaire : quantification du pourcentage de cellules saines, c'est-à-dire présentant une activité métabolique ainsi qu'une membrane externe et des organites intacts. Une baisse de viabilité (cytotoxicité) est due aux effets nocifs d'un produit chimique d'essai sur la structure et la fonction cellulaires. La viabilité cellulaire est donnée en pourcentage de la viabilité observée dans le témoin négatif ou solvant réalisé en parallèle.

FBS : *Fetal Bovine Serum* (sérum bovin fœtal).

IATA : *Integrated Approach to Testing and Assessment* (approche intégrée en matière d'essai et d'évaluation).

ISO : Organisation internationale de normalisation.

ITS : stratégie d'essai intégrée.

K_{OE} : propriété physico-chimique d'un produit chimique qui reflète son coefficient de partage octanol-eau.

L-15/ex : milieu exempt de protéines qui contient la même quantité de sels, de galactose et de pyruvate que le milieu de Leibovitz L-15, et qui est utilisé lors de l'exposition des cellules de RTgill-W1 à un produit chimique d'essai (d'où la mention « /ex »). La préparation du L-15/ex est décrite aux annexes 3 à 5.

LD : ligne directrice pour les essais.

Milieu de culture L-15 complet : milieu de Leibovitz L-15 additionné de 5 % de FBS et éventuellement d'antibiotiques, par exemple 0.5 % de gentamicine (annexes 3 et 6).

PBS : tampon phosphate salin, solution saline tamponnée au phosphate.

pK_a : propriété physico-chimique d'un produit chimique qui renvoie à sa constante de dissociation acide.

PrestoBlue™ : exemple de préparation d'indicateur coloré contenant de la résazurine prête à l'emploi destinée à l'évaluation de l'activité métabolique cellulaire (n° CAS de la résazurine : 550-82-3).

QSAR : *Quantitative Structure-Activity Relationship* (relation quantitative structure-activité).

Rouge neutre (n° CAS 553-24-2) : indicateur coloré permettant d'évaluer l'intégrité de la membrane lysosomale.

RTgill-W1 : lignée cellulaire établie à partir de cellules immortalisées de branchies de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) [6].

RV : rapport de validation.

Solution de congélation des cultures cellulaires : milieu de Leibovitz L-15 additionné de 10 % de FBS et 10 % de DMSO, utilisé pour congeler les cultures cellulaires (voir l'annexe 6).

Témoin négatif : milieu d'exposition L-15/ex sans produit chimique d'essai ni solvant organique.

Témoin positif : toute substance de référence bien caractérisée qui, utilisée dans une méthode d'essai donnée, permet de démontrer que le système d'essai produit une réponse reproductible et adéquate. Les modes opératoires décrits dans le présent document ont été validés avec comme témoin positif la 3,4-dichloroaniline (3,4- DCA), car cette substance est facile à manipuler et déjà le témoin positif de la norme ISO 15088 et de la LD 236 de l'OCDE. D'autres substances peuvent constituer des témoins positifs acceptables, à condition qu'elles produisent des résultats reproductibles et adéquats avec le système d'essai décrit (RV – 3.3.8.3.).

Témoin sans cellules : deux puits par plaque d'essai qui ne contiennent aucune cellule et permettent de déterminer le fond de fluorescence ; un puits contient du L-15/ex, le second contient du L-15/ex et le produit chimique d'essai à sa plus forte concentration d'essai (paragraphe 13 et 17).

Témoin solvant : dans la présente méthode, le milieu d'exposition (L-15/ex) additionné de la concentration de solvant organique utilisée dans l'essai (p. ex., le diméthylsulfoxyde ou DMSO). Le témoin solvant n'est nécessaire que dans les cas où le produit chimique d'essai est dissout dans un solvant organique tel que le DMSO.

UVCB : substances de composition inconnue ou variable, produits de réactions complexes ou matériels biologiques.

ANNEXE 2 : Appareillage et matériel pour l'évaluation de la viabilité cellulaire

Appareillage de base		
Équipement et matériel		Exemple de fournisseur
1	Poste de sécurité microbiologique	HeraSafe ; Kendro
2	Incubateur	BK-700, (3 – 40 °C) ; Heraeus Instruments
3	Microscope	Axiovert 40C ; ZEISS
4	Pompe à vide	Mini-Vac eco ; Axonlab
5	Pipettes Pasteur (stériles)	230 mm ; VWR
6	Pipettes en verre (stériles)	5 mL, 10 mL, 20 mL ; VWR
7	Pipeteur (auxiliaire de pipetage)	Pipetus-akku ; Hirschmann Laborgeräte
8	Boîtes de stérilisation pour pipettes	612-2089 ; VWR
9	Embouts de pipette (stériles)	10 µL, 100 µL, 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL ; Socorex
10	Pipettes	10 µL, 100 µL, 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL ; Socorex
11	Pipette multicanaux	50 - 1200 µL ; Research pro, Eppendorf
12	Embouts pour pipette multicanaux	50 - 1000 µL ; Eppendorf (Allemagne) ; 613-3505 (p. ex. via VWR)

13	Réservoirs à réactifs (autoclavables ou stériles)	613-2671 ; VWR
14	Vortex	Vortex Genius 3 ; IKA

Ensemencement des cellules et exposition des plaques

Équipement et matériel		Exemple de fournisseur
15	Flacons de culture cellulaire	75 cm ² avec bouchon à vis ventilé ; 90075 ; TPP
16	Centrifugeuse	Heraeus Labofuge 400R (0 – 40 °C ; 17 -3900 g) ; Thermo Science
17	Tubes en plastique à centrifuger (15 mL, stériles)	91015 ; TPP
18	Tubes en plastique à centrifuger (50 mL, stériles)	91050 ; TPP
19	Chambre de numération	Cellule de Neubauer (modifiée) ; VWR
ou	Compteur de cellules	Casy1, Schärfe System (p. ex. via Roche) Tampon CasyTon, 10 L, 05651808001 ; cuves pour Casy (Roche) ; 2 x 900 cuves, 05651794001 ; Roche
20	Plaques multipuits (24 puits)	662160 ; Greiner-Bio-one. Utiliser des plaques stériles à surface hydrophile (traitement de surface pour culture tissulaire) pour obtenir une meilleure adhésion cellulaire, une clarté optique élevée et une faible autofluorescence (interférence de fond).

Préparation et dosage des solutions mères

Équipement et matériel		Exemple de fournisseur
21	Hotte	
22	Balance	AE50 ; Mettler Toledo
23	Flacons en verre ambré (4 mL)	27116-U ; Supelco ; Sigma-Aldrich
24	Osmomètre	Vapro 5600 ; Wescor
25	pH-mètre	pH-mètre 605 et électrodes de réf. 6.0220.100 ; Metrohm
26	Bouchons à vis pour flacons en verre ambré (4 mL), garniture en aluminium	27142 ; Supelco ; Sigma-Aldrich
27	Flacons en verre ambré stérilisés (20 mL)	EPA20-B 20ml Flacons ambrés EPA à col fileté 24-400, 57 x 27.5 mm, 100 pièces ; BGB

28	Bouchons à vis pour flacons en verre ambré stérilisés (20 mL)	Bouchons à vis avec trou central (blanc) SV-EPA, type PP, pour col fileté 24-400, septum en silicone/PTFE, 100 pièces ; BGB. Éviter les bouchons à septum collé
29	Agitateur orbital pour flacons	IKA KS125 ; IKA
30	Flacons en verre Duran	100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 L ; p. ex. Schott
31	Pipettes en plastique	50 mL
32	Éprouvette graduée (stérilisée)	500 mL
33	Film autocollant (Ruban de scellage)	Film en polyester avec adhésif acrylique, Nunc, 732-2610 (p. ex. via VWR)

Échantillonnage

Équipement et matériel		Exemple de fournisseur
34	Flacons d'échantillonnage	Flacons à filetage court 1.5 mL, 32 x 11.6 mm, en verre clair, classe hydrol. 1, à large ouverture, avec repère de volume et surface de marquage ; 548-0029 · VWR
35	Bouchons de flacons à septum fixe	Bouchon à septum UltraBond 9 mm : type PP noir, à filetage court avec orifice central ; septum en silicone blanc/PTFE rouge, 45° shore A (dureté), 1.3 mm (épaisseur) ; 09 04 1220 chez La-Pha-Pack ou 548-0371 chez VWR. Les flacons dotés d'un bouchon à septum fixe (préassemblé) sont particulièrement indiqués pour le transport/l'envoi d'échantillons. Pour d'autres usages, les bouchons à septum non assemblé sont aussi valables.
36	Cyclohexane	Réactif de qualité ACS/puriss. p.a., pureté ≥ 99.5 % (CPG) ; 33117 ; Sigma-Aldrich
37	Boîtes de rangement pour microtubes	HEATHS120035 ; VWR

Détection de la viabilité cellulaire

Équipement et matériel		Exemple de fournisseur
38	Lecteur de plaques en fluorescence	Infinite M200 ; Tecan
39	Tubes en plastique à centrifuger (50 mL)	91050 ; TPP
40	Agitateur de plaques	TIMIX ; Johannes Otto GmbH

41	Papier aluminium	Ou bien, utiliser une boîte pour protéger les plaques d'essai de la lumière pendant l'incubation avec le colorant.
42	Papier essuie-tout	

ANNEXE 3 : Réactifs, milieu et solutions destinés à l'évaluation de la viabilité cellulaire

Dans la mesure du possible, on utilisera uniquement des produits chimiques de qualité culture cellulaire.

Réactifs prêts à l'emploi disponibles dans le commerce :

	Exemple de fournisseur	Conditions de conservation
Sérum bovin (FBS)	Sérum bovin fœtal CVFSVF00-01 (Eurobio) Note : ne pas inactiver le FBS à la chaleur [Nims R.W. et Harbell J.W. (2017). In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal., 53:682–690.]	Décongeler avant utilisation et préparer des aliquotes de 25 mL dans des tubes stériles adaptés. Conserver à -20 °C
Gentamicine	10 mg/mL p. ex. LONZ02-012E (Lonza) ou BCHRA2712 (Biochrom)	Suivre les recommandations du fabricant
Trypsine	0.25 % dans du PBS sans Ca ²⁺ sans Mg ²⁺ , L11-002 (PAA)	Décongeler avant utilisation et préparer des aliquotes de 10 mL dans des tubes stériles adaptés. Conserver à -20 °C
Versène (0.2 g/L EDTA dans du PBS)	1:5000, 15040 (Gibco)	Conserver à 4 °C
Milieu L-15 de Leibovitz	avec glutamine, sans rouge de phénol 21083 (Gibco)	Conserver à 4 °C
Formaldéhyde 37 % (m/v)	F1635-500ML ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante
Acide acétique	<i>BioUltra</i> , ≥ 99.5 % (CPG/T), 45726-1L-F ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante
Préparation prête à l'emploi de colorant contenant de la résazurine	Solution alamarBlue™ - DAL1100 ; Invitrogen	Conserver à 4 °C
CFDA-AM	1354 ; Invitrogen	Conserver à -20 °C
Solution de rouge neutre	N2889 ; Sigma-Aldrich	Conserver à 4 °C

PBS 10x de Dulbeccos	avec Ca^{2+} et Mg^{2+} ; 14080-089, Invitrogen	Conserver à température ambiante
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	≥99.9 %, qualité biologie moléculaire D8418-250ML ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante
Éthanol (absolu)	pour analyse, 1.00983.1000 ; Merck	Conserver à température ambiante
Chlorure de calcium (CaCl_2)	≥ 96 %, anhydre, pour culture cellulaire C5670-100G ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante
Chlorure de sodium (NaCl)	≥ 99 %, pour culture cellulaire S5886-1KG ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante
Chlorure de potassium (KCl)	≥ 99 %, pour culture cellulaire P5405-250G ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante
Sulfate de magnésium (MgSO_4)	≥ 98 %, pour culture cellulaire M2643-500G ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante
Chlorure de magnésium (MgCl_2)	≥ 97 %, pour culture cellulaire M4880-100G ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante
Galactose	≥ 96 %, anhydre, pour culture cellulaire G5388-100G ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante
Pyruvate de sodium	≥ 99 %, pour culture cellulaire P5280-100G ; Sigma-Aldrich	Conserver à 4 °C
Phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4)	≥ 99 %, pour culture cellulaire S5136-100G ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante
Phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4)	≥ 99 %, pour culture cellulaire P5655-100G ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante
Eau déminéralisée	Résistivité : ≤ 18.2 MΩ × cm	
3,4-dichloroaniline	35827, PESTANAL®, norme analytique ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante

Préparation de solutions fraîches :

Milieu de culture L-15 complet	Ajouter à 500 mL de L-15 : 25 mL FBS 2.5 mL gentamicine (note : les laboratoires expérimentés peuvent procéder sans antibiotique)	Conserver à 4 °C (délai maximal de conservation : 3 mois)
--------------------------------	--	--

<p>Solution saline A (concentration 10x pour le milieu L-15/ex)</p>	<p>80 g NaCl 4.0 g KCl 0.98 g MgSO₄ 0.94 g MgCl₂ Ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'à atteindre 600 mL</p>	<p>Autoclaver Conserver à température ambiante (délai maximal de conservation : 6 mois)</p>
<p>Solution saline B (concentration 10x pour le milieu L-15/ex)</p>	<p>1.4 g CaCl₂ Ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'à atteindre 100 mL</p>	<p>Autoclaver Conserver à température ambiante (délai maximal de conservation : 6 mois)</p>
<p>Solution saline C (concentration 10x pour le milieu L-15/ex)</p>	<p>1.9 g Na₂HPO₄ 0.6 g KH₂PO₄ Ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'à atteindre 300 mL</p>	<p>Autoclaver Conserver à température ambiante (délai maximal de conservation : 6 mois)</p>
<p>Solution de galactose (concentration 10x pour le milieu L-15/ex)</p>	<p>9.0 g galactose Ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'à atteindre 100 mL</p>	<p>Stériliser par filtration (0.2 µm) Répartir dans des aliquotes de 12 mL Conserver à -20 °C (délai maximal de conservation : 6 mois)</p>
<p>Solution de pyruvate de sodium (concentration 10x pour le milieu L-15/ex)</p>	<p>5.5 g pyruvate de sodium Ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'à atteindre 100 mL</p>	<p>Stériliser par filtration (0.2 µm). Répartir dans des aliquotes de 12 mL Conserver à -20 °C (délai maximal de conservation : 6 mois)</p>
<p>L-15/ex (conditionnement aseptique)</p>	<p>60 mL solution saline A 10 mL solution saline B 30 mL solution saline C 10 mL solution de galactose 10 mL solution de pyruvate de sodium Ajouter de l'eau déminéralisée stérile jusqu'à atteindre 1000 mL</p>	<p>Conserver à température ambiante (délai maximal de conservation : 3 mois)</p>

Solution mère de CFDA-AM à 4 mM	5 mg CFDA-AM 2.32 mL DMSO	Préparer des aliquotes de 200 µL Conserver à -20 °C
PBS	900 mL eau déminéralisée 100 mL PBS de Dulbecco	Mélanger et ajuster le pH à 7.1 (avec du NaOH 10N) Conserver à température ambiante
Solution de travail de résazurine et CFDA-AM [p. ex., 5 % (v/v) alamarBlue™ et CFDA-AM à 4 µM dans du PBS]	11.4 mL PBS 600 µL alamarBlue™ 12 µL solution mère de CFDA-AM	Préparer une solution fraîche au moment de tester la viabilité cellulaire
Solution de travail de rouge neutre	11.82 mL PBS 180 µL solution de rouge neutre	Préparer une solution fraîche au moment de tester la viabilité cellulaire
Solution de fixation	5 g CaCl ₂ 6.75 mL formaldéhyde 37 % (m/v) Ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'à atteindre 1000 mL	Conserver à température ambiante (délai maximal de conservation : 6 mois)
Solution d'extraction	500 mL éthanol absolu 10 mL acide acétique (100 %) Ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'à atteindre 1000 mL	Conserver à température ambiante (délai maximal de conservation : 6 mois)

ANNEXE 4 : Mode opératoire normalisé pour la réalisation de l'essai avec produit chimique d'essai dissout dans le solvant organique DMSO

A4.1. Mesures régulières à des fins d'assurance qualité

La présente méthode d'essai utilise la lignée de cellules branchiales de truite arc-en-ciel RTgill-W1, cultivée selon le mode opératoire défini à l'annexe 6, et qui doit être exempte de toute contamination microbienne ou chimique. Les différentes étapes de réalisation de l'essai doivent être consignées dans le cahier de laboratoire, avec l'aide des modèles fournis à l'annexe 5.

A4.2. Éléments de base pour l'évaluation de la cytotoxicité

A4.2.1. Témoins

Témoin sans cellules : puits ne contenant aucune cellule destinés à déterminer le fond de fluorescence (voir plan de plaque, graphique annexe 4-5).

Étant donné que les trois indicateurs de viabilité cellulaire utilisés reposent sur la mesure de fluorescence, il convient de s'assurer de l'absence d'interférence causée par l'autofluorescence du produit chimique d'essai. Afin de détecter une éventuelle autofluorescence, on laisse donc deux puits sans cellules ; l'un est rempli de milieu d'exposition seul, l'autre de milieu d'exposition contenant le produit chimique, dans son solvant organique, à la plus forte concentration d'essai (ceci afin de détecter la plus forte autofluorescence théoriquement observable). On fixe un seuil arbitraire de 20 %, autrement dit on considère qu'une hausse > 20 % de la fluorescence dans le second puits par rapport au premier (sans produit chimique d'essai) indique un risque d'interférence dû à l'autofluorescence. Ce critère de qualité, par sa nature même, devrait être systématiquement visible avec chaque réplicat biologique et chaque indicateur coloré. Si une autofluorescence apparaît systématiquement de cette manière, il convient de préparer une plaque témoin entièrement sans cellules et de tester toutes les concentrations du produit chimique d'essai, afin d'obtenir toutes les valeurs de fond de fluorescence en fonction de la concentration. Si aucune interférence n'est détectée, les valeurs mesurées dans les deux puits témoins sans cellules sont considérées comme des valeurs témoins (paragraphe A4.8.1).

Témoin négatif : milieu d'exposition (L-15/ex) dans un puits contenant des cellules.

Témoin solvant : milieu d'exposition (L-15/ex) plus le solvant organique à la concentration utilisée dans l'essai (p. ex., le diméthylsulfoxyde ou DMSO), dans un puits contenant des cellules.

Le témoin solvant permet de détecter d'éventuelles contaminations chimiques croisées du solvant organique qui pourraient être dues à des erreurs de

manipulation et provoquer une diminution de la viabilité cellulaire. Si le témoin solvant génère une fluorescence inférieure de strictement plus de 10 % à la fluorescence du témoin négatif, il faut résoudre le problème, à savoir identifier l'origine de la contamination croisée (paragraphe A4.8.2).

Témoin positif : 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA), qui permet de vérifier la performance de l'essai (paragraphe A4.8.3).

A4.2.2. Analyses chimiques

La quantification des concentrations d'exposition du produit chimique d'essai permet d'exprimer les résultats de l'essai au regard de l'exposition réelle. On prélèvera donc, pour l'analyse chimique, des échantillons dans les puits au début (0 h) et à la fin de l'exposition (24 h, soit immédiatement avant de procéder au test de viabilité cellulaire). La durée totale de prélèvement des échantillons doit être la plus courte possible afin d'éviter l'évaporation du produit chimique d'essai.

A4.3. Appareillage et matériel

La liste de l'appareillage et du matériel figure à l'annexe 2.

A4.4. Réactifs, milieux et solutions

La liste des réactifs, milieux et solutions figure à l'annexe 3.

A4.5. Mise en œuvre de l'essai

On trouvera une description générale de l'ensemble de la procédure d'essai au graphique 2 de la Ligne directrice.

A4.5.1. Ensemencement des cellules dans les plaques 24 puits

Ensemencer une plaque 24 puits complète par réplicat biologique. Une couche confluite de cellules RTgill-W1 cultivées dans un flacon 75 cm² contient environ 10 millions de cellules, ce qui suffit à ensemer une plaque entière.

A4.5.1.1. Préparation du matériel et des solutions de travail pour l'ensemencement

Décongeler la trypsine. Porter la trypsine, le versène et le milieu L-15 complet à 19 ± 1 °C dans un incubateur pendant au moins une heure avant d'ensemencer. Allumer le poste de sécurité

microbiologique, désinfecter son plan de travail conformément aux procédures stériles du laboratoire et laisser l'air se renouveler pendant 10 à 15 minutes. Désinfecter les boîtes à pipettes (Pasteur et en verre), les bouteilles de trypsine, de versène et de milieu de culture L-15 complet, ainsi que les flacons de culture cellulaire conformément aux procédures stériles du laboratoire, avant de les poser à l'intérieur du poste de sécurité microbiologique.

En fonction de la méthode choisie, préparer la chambre de numération pour le comptage manuel des cellules, ou bien le compteur de cellules électrique pour un comptage automatisé. Dans le présent mode opératoire normalisé, des exemples sont fournis pour la *cellule de Neubauer* et le *compteur de cellules Casy1*.

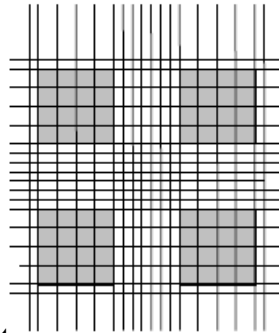
A4.5.1.2. Mode opératoire détaillé d'ensemencement des cellules

Ensemencement d'une plaque (avec les cellules d'un flacon de culture ayant atteint la confluence) :

- a) Au microscope, vérifier l'état de la culture cellulaire dans le flacon.
- b) Si la culture est confluente (graphique 4 de la LD), préparer les cellules comme suit.
- c) Aspirer le milieu de culture à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et d'une pompe à vide.
- d) Déposer délicatement 1 mL de versène (**note** : ne pas verser directement le versène sur les cellules, elles pourraient se détacher).
- e) Rincer les cellules en agitant délicatement le flacon de culture.
- f) Aspirer le versène et répéter les étapes de rinçage d), e), f).
- g) Après avoir enlevé le versène du deuxième rinçage, ajouter 0.7 mL de trypsine.
- h) Les cellules se détacheront au bout de 0.5 à 5 minutes ; pour accélérer le processus, tapoter et agiter délicatement le flacon de culture cellulaire (vérifier visuellement que les cellules se détachent, ne pas prolonger la trypsination plus de 5 minutes).
- i) Ajouter 3 à 5 mL de milieu de culture L-15 complet pour interrompre l'action de la trypsine.
- j) Suspendre les paquets de cellules à la pipette ; pour détacher les cellules qui adhèrent encore à la surface du flacon, pipeter délicatement la solution plusieurs fois, par aspiration et refoulement, en recouvrant les cellules attachées (éviter à tout prix la formation de mousse, car les forces de cisaillement pourraient provoquer la rupture des cellules).
- k) Transférer la suspension de cellules dans un tube en plastique à centrifuger de 15 mL.
- l) Centrifuger pendant 3 minutes à 875 g et à 18-21 °C.
- m) Éliminer autant de liquide surnageant que possible sans aspirer le culot de cellules.
- n) Suspendre le culot cellulaire dans 5 mL de milieu de culture L-15 complet et, sans créer de mousse, mélanger délicatement la suspension 3 à 5 fois à la pipette, par aspiration et refoulement ou contre la paroi du tube.
- o) Compter les cellules présentes dans la suspension cellulaire en procédant à deux échantillonnages indépendants (répéter l'étape n de suspension avant de prélever le deuxième échantillon) suivant la méthode de numération choisie :

- cellules de Neubauer : appliquer 10 μ L de suspension cellulaire et compter les cellules dans au moins deux carrés (marqués en gris, graphique annexe 4-1) ;
- compteur de cellules Casy1 : ajouter 10 μ L de suspension cellulaire à 10 mL de tampon CasyTon et compter les cellules d'une taille comprise entre 10 et 20 μ m en suivant les instructions du fabricant.

Exemple avec la cellule de Neubauer :



Graphique annexe 4-1 : Représentation simplifiée des zones de numération d’une cellule de Neubauer (en gris). On notera le nombre de cellules dans chaque carré gris.

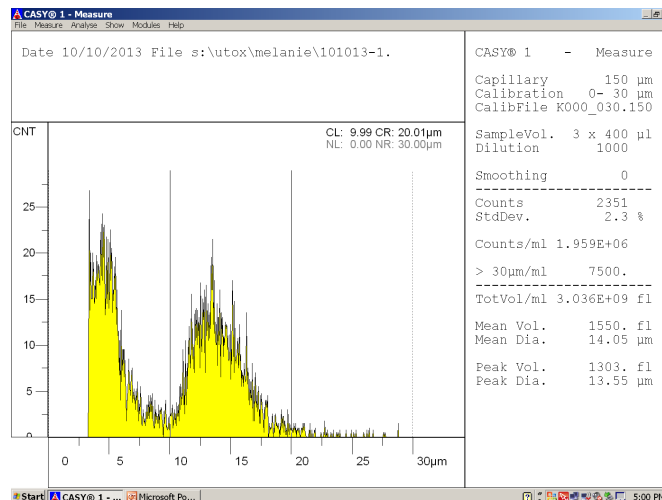
Évaluer le nombre de cellules dans 1 mL :

Exemple :

- nombre de cellules comptées dans deux carrés : 198 et 192, ⇒ moyenne : 195
- 100 cellules comptées correspondent à 1 000 000 cellules/mL

$$- \frac{195 \times 1000000}{100} = 195 \times 10^4 \text{ cellules / mL}$$

Exemple avec le compteur de cellules Casy1 :



Graphique annexe 4-2 : Distribution de 10 µL de suspension cellulaire diluée dans 10 mL de CasyTon. Les cellules RTgill-W1 mesurent entre 10 et 20 µm.

Exemple :

On dénombre 1.959×10^6 cellules de 10 à 20 µm par mL.

- p) Si la différence entre les deux comptages indépendants de cellules est supérieure à 10 %, réaliser un troisième comptage et calculer la moyenne des deux résultats les plus proches.
- q) Calculer le volume de la suspension cellulaire préparée à l'étape n) nécessaire à la préparation de 25 mL de solution d'ensemencement d'une plaque 24 puits à une densité cellulaire de 350 000 cellules/mL :

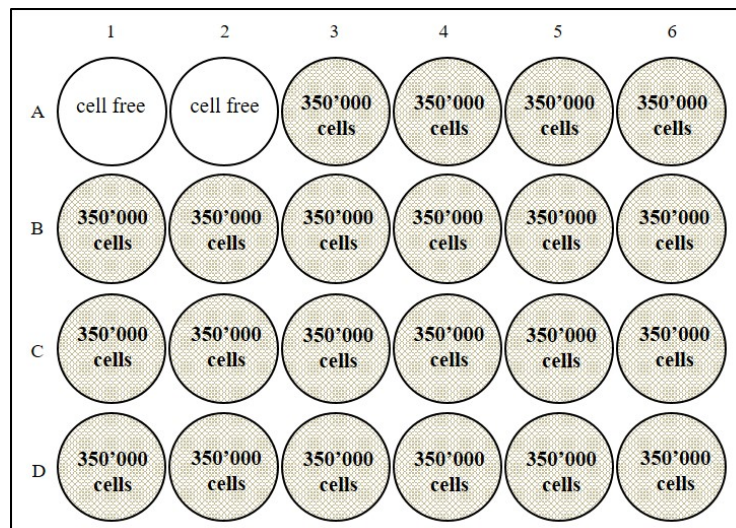
Exemple :

Dans chaque puits d'une plaque 24 puits, on veut déposer 350 000 cellules dans un volume de 1 mL.

$$\frac{\text{Nb cellules}_{\text{requis}} \times \text{Volume total requis}}{\text{Nb cellules}_{\text{compté}}} = \text{Volume requis pour solution d'ensemencement}$$

$$\Rightarrow \frac{350000 \text{ cellules} \times 25 \text{ mL}}{1.959 \times 10^6 / \text{mL}} = \frac{35 \times 10^4 / \text{mL} \times 25 \text{ mL}}{195.9 \times 10^4 / \text{mL}} = 4.47 \text{ mL}$$

- r) Pour obtenir la solution d'ensemencement, transférer le volume nécessaire de suspension cellulaire dans un nouveau tube 50 mL en plastique et ajouter du milieu de culture L-15 complet jusqu'à atteindre 25 mL. Homogénéiser délicatement au moins 3 ou 4 fois à la pipette par aspiration et refoulement.
- s) Transférer 1 mL de solution d'ensemencement par puits d'une plaque 24 puits (en procédant puits par puits ou à l'aide d'une pipette multicanaux), sauf dans les puits témoins sans cellules (A1 et A2, plan d'ensemencement du graphique annexe 4-3). Veiller à homogénéiser délicatement la solution d'ensemencement pendant toute la procédure, afin d'éviter la formation d'amas de cellules. Refermer le couvercle de la plaque.
- t) Incuber la plaque à 19 ± 1 °C pendant 24 h.



Graphique annexe 4-3 : Plan d'ensemencement dans les plaques 24 puits (volume d'ensemencement 1 mL par puits)

A4.5.1.3. Préparation des échantillons à des fins d'analyse chimique

Avant de préparer les solutions mères et les solutions d'exposition, préparer les flacons d'échantillonnage. Le nom de chaque échantillon doit impérativement être écrit de manière lisible et à l'encre indélébile. On utilisera donc des feutres résistants à l'eau et à la lumière ou des étiquettes adhésives résistantes imprimées au laser. Si l'on choisit les étiquettes, celles-ci ne doivent pas empêcher de voir le contenu des flacons.

A4.5.2. Préparation des solutions mères de produit chimique d'essai dans le DMSO

Les solutions mères de produit chimique d'essai dissout dans le DMSO doivent être 200 fois plus concentrées que les concentrations d'exposition finales du produit en question, afin d'obtenir une fraction volumique finale de DMSO dans le milieu d'exposition de 0.5 % (v/v), une concentration nettement inférieure au seuil de cytotoxicité du solvant. Peser la quantité adéquate de produit chimique d'essai dans un flacon 4 mL en verre ambré et ajouter le volume de DMSO correspondant ; puis, mélanger la première solution mère pendant au moins 15 minutes à l'aide d'un mélangeur. Utiliser cette solution mère comme point de départ pour une dilution en série dans le DMSO d'un facteur constant ne dépassant pas 2.5 (graphique 2 de la LD, 2^e jour). Les séries de dilution de produit chimique d'essai doivent être préparées fraîches chaque jour de l'expérience. On veillera particulièrement à ce que le DMSO reste exempt de toute contamination. Il est recommandé d'utiliser une nouvelle bouteille et de préparer des aliquotes plus petites qui serviront ensuite à préparer les séries de dilution de produit chimique d'essai. Cela évite de réutiliser trop souvent la bouteille d'origine de DMSO et réduit donc le risque de contamination du solvant.

Les produits chimiques d'essai sous forme solide à température ambiante peuvent être directement pesés dans un flacon 4 mL en verre ambré.

Pour les produits chimiques d'essai sous forme liquide à température ambiante, transférer à la pipette un volume donné du produit chimique dans un flacon 4 mL en verre ambré et le peser. Pour calculer le volume de DMSO à ajouter, retrancher le volume de produit chimique pipeté.

Exemple : - 80 µL de produit chimique pèsent 103.6 mg
- pour obtenir la concentration nominale de 40 g/L, ajouter 2.51 mL de DMSO (103.6 mg à une concentration de 40 mg/mL donne un volume total de 2.59 mL, et 2.59 mL – 0.08 mL (volume de produit chimique) = 2.51 mL DMSO)

A4.5.3. Préparation des solutions d'exposition dans le L-15/ex

Réaliser les étapes A4.5.3 et A4.5.4 sous conditions stériles. Allumer le poste de sécurité

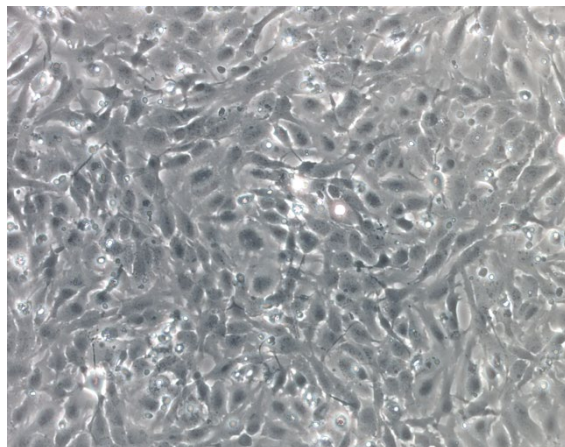
microbiologique et laisser l'air se renouveler pendant 10 à 15 minutes. Désinfecter le poste conformément aux procédures stériles du laboratoire. Désinfecter le matériel nécessaire à la préparation des solutions diluées conformément aux procédures stériles du laboratoire avant de le poser à l'intérieur du poste de sécurité microbiologique.

On prépare les solutions d'exposition en diluant chacune des solutions mères dans le milieu d'exposition L-15/ex, sous conditions stériles, dans un flacon 20 mL stérile en verre ambré. Les solutions d'exposition doivent être préparées fraîches immédiatement avant l'exposition des cellules.

Pour préparer les solutions d'exposition à partir des solutions mères de DMSO, commencer par placer sept flacons 20 mL stériles en verre ambré à l'intérieur du poste de sécurité microbiologique. Dans chaque flacon, ajouter 12 mL de L-15/ex et 60 µL, au choix, (a) d'une des solutions mères de produit chimique d'essai dans le DMSO (une concentration, un flacon), ou (b) de DMSO seul (graphique 2 de la LD, 2^e jour). Mélanger vigoureusement les solutions d'exposition pendant 10 minutes au mélangeur orbital.

A4.5.4. Mode opératoire pour l'exposition au produit chimique d'essai et pour le prélèvement d'échantillons à des fins d'analyse chimique au début de l'exposition (c0h)

Après l'ensemencement puis les 24 h d'incubation, les cellules devraient avoir formé une couche confluyente dans chaque puits (graphique annexe 4-4). Les couches sont visibles au microscope. Si la confluence n'est toujours pas atteinte au bout de 24 h, incuber à nouveau la plaque pendant 24 à 48 h avant d'exposer les cellules au produit chimique d'essai.



graphique annexe 4-4 —
W1 prise 24 h après
(densité
350 000 cellules

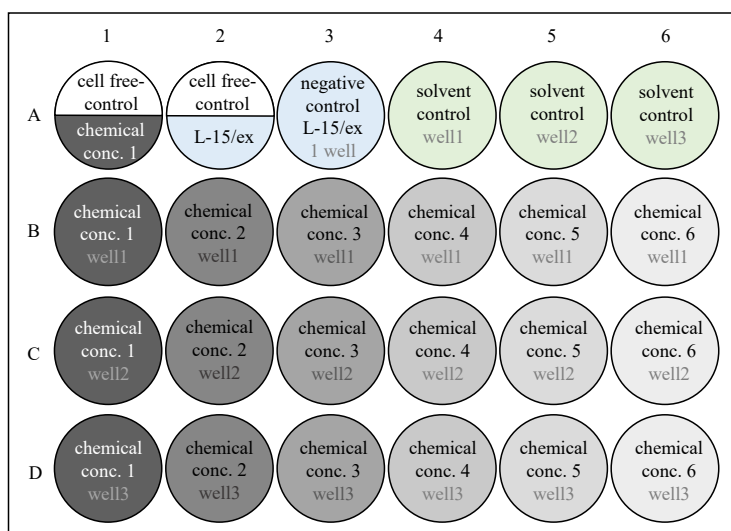
distribution régulière des cellules, qui tapissent tout le puits.

Image de cellules RTgill-
l'ensemencement
d'ensemencement :
par mL). On observe une

Si la méthode analytique choisie l'exige, pré-remplir les microtubes 1.5 mL avec du solvant et les refermer sans enfoncer les capuchons de sécurité, afin de les rouvrir facilement au moment d'ajouter les échantillons de milieu d'exposition. Pour éviter les erreurs, il est recommandé de

reproduire le plan de plaque dans le portoir à microtubes.

- Retirer la totalité du milieu de culture L-15 complet de chaque puits. Faire basculer légèrement la plaque pour faciliter le pipetage et veiller à ne pas toucher les cellules avec la pipette Pasteur. Il est aussi possible de vider la plaque en renversant son contenu directement dans un bac et en séchant la plaque à l'essuie-tout. Passer immédiatement à l'étape suivante.
- Ajouter délicatement 1 mL de L-15/ex dans chaque puits à l'aide de la pipette multicanaux (**note** : faire couler le L-15/ex contre la paroi des puits et non directement sur les cellules, pour ne pas détacher les cellules du fond du puits) et rincer les puits en agitant manuellement, et délicatement, la plaque.
- Retirer le L-15/ex ou renverser la plaque et sécher à l'essuie-tout.
- Dans chaque puits, ajouter 2.5 mL de la solution d'exposition prévue dans le plan de plaque, sauf dans le témoin négatif (y ajouter du L-15/ex) et dans les témoins sans cellules (voir ci-après « puits témoins sans cellules ») (graphique annexe 4-5 et graphique 2 de la LD, 2^e jour ; **note** : faire couler le milieu d'exposition contre la paroi des puits et non directement sur les cellules, pour ne pas détacher les cellules du fond du puits). Pendant cette manipulation, laisser le couvercle sur la plaque et ne l'ouvrir que pour pipeter, afin d'éviter que les couches cellulaires encore non exposées se dessèchent.
- Retirer *immédiatement* 500 µL d'échantillon de chacun des trois puits par concentration et des trois puits témoins solvant, et les transférer dans leurs microtubes d'échantillonnage respectifs, pré-remplis ou non avec un solvant, selon le protocole analytique choisi. Refermer immédiatement les microtubes hermétiquement en enfonçant le capuchon de sécurité.
- Couvrir la plaque d'un film adhésif.
- Incuber la plaque à 19 ± 1 °C dans l'obscurité pendant 24h.



Graphique annexe 4-5 - Plan de plaque pour un produit chimique d'essai (un produit chimique d'essai, 6 concentrations d'essai et 3 réplicats par plaque)

Puits témoins sans cellules :

Les puits sans cellules sont soumis au même traitement que les puits avec cellules. Un témoin sans cellules est rempli avec 2 mL de L-15/ex et sert à tenir compte du fond de fluorescence des indicateurs colorés. L'autre sert à détecter d'éventuelles interférences entre le produit chimique d'essai et les indicateurs colorés fluorescents. Dans ce témoin, ajouter 2 mL de la solution d'exposition contenant la plus forte concentration du produit chimique d'essai. Si une interférence est relevée (c.-à-d., un écart entre fluorescence > 20 % entre le témoin sans cellules exposé et le témoin sans cellules traité par L-15/ex seul), une plaque témoin entièrement sans cellules doit être soumise à la procédure d'essai et les résultats obtenus serviront de référence pour les essais suivants avec le produit chimique d'essai concerné. Si aucune interférence n'est détectée, les valeurs mesurées dans les deux puits témoins sans cellules sont considérées comme des valeurs témoins.

A4.5.5. Détermination de la cytotoxicité

A4.5.5.1. Préparation du matériel et des solutions de travail destinés à mesurer la cytotoxicité

Préparer les solutions de travail d'AlamarBlue™/CFDA-AM et de rouge neutre (l'AlamarBlue est un exemple d'indicateur coloré contenant de la résazurine) tel qu'indiqué dans l'annexe 3. Dans le cas où plusieurs plaques seraient mesurées en parallèle, adapter les volumes de solutions de travail d'indicateurs colorés au nombre de plaques.

A4.5.5.2. Inspection visuelle de lésions cellulaires

La première vérification de la performance de l'essai consiste à observer visuellement les cellules dans la plaque en prêtant une attention particulière au degré de leurs lésions éventuelles. Il est recommandé de procéder à la vérification visuelle à l'étape d) du mode opératoire décrit au paragraphe A4.5.5.3, c'est-à-dire après le retrait du film adhésif et du produit chimique d'essai. Cela facilitera l'observation des cellules.

La graphique 6 de la LD montre des cellules ayant subi différents degrés de lésions après exposition au témoin positif 3,4-DCA ; ces images servent de guide pour assurer une performance optimale de l'essai.

A4.5.5.3. Mode opératoire pour la mesure de la cytotoxicité et pour le prélèvement d'échantillons à des fins d'analyse chimique en fin d'exposition (c_{24h})

Si la méthode analytique choisie l'exige, pré-remplir les microtubes 1.5 mL avec du solvant et les refermer sans enfoncer les capuchons de sécurité, afin de les rouvrir facilement au moment

d'ajouter les échantillons de milieu d'exposition. Pour éviter les erreurs, il est recommandé de reproduire le plan de plaque dans le portoir à microtubes (graphique annexe 4-5).

- a) Retirer le film adhésif de la plaque. Dans chaque puits, prélever 500 µL de milieu d'exposition et les transférer dans les microtubes correspondants en vue d'une analyse chimique au point 24 h. Refermer immédiatement les microtubes hermétiquement en enfonçant le capuchon de sécurité.
- b) Éliminer le reste de la solution d'exposition. Faire basculer légèrement la plaque pour faciliter le pipetage et veiller à ne pas toucher les cellules avec la pipette Pasteur. Il est aussi possible de vider la plaque en renversant son contenu directement dans un bac et en séchant la plaque à l'essuie-tout. Passer immédiatement à l'étape suivante.
- c) Laver chaque puits avec 1000 µL de PBS (annexe 3 ; **note** : faire couler le PBS contre la paroi des puits et non directement sur les cellules, pour ne pas détacher les cellules du fond du puits).
- d) Refermer le couvercle de la plaque et observer visuellement les cellules (paragraphe A4.5.5.2).
- e) Éliminer la solution de rinçage.
- f) Dans chaque puits, introduire 400 µL de la solution de travail d'AlamarBlue™/CFDA-AM (**note** : faire couler l'indicateur coloré contre la paroi des puits et non directement sur les cellules, pour ne pas détacher les cellules du fond du puits).
- g) Couvrir la plaque avec son couvercle et incuber à 19 ± 1 °C pendant 30 minutes dans l'obscurité (p. ex., envelopper la plaque d'aluminium).
- h) Mesurer d'abord la fluorescence de l'AlamarBlue™ (longueurs d'onde fournies ci-dessous), puis la fluorescence du CFDA-AM (longueurs d'onde fournies ci-dessous) à l'aide du lecteur de plaques en fluorescence.
- i) Éliminer la solution de travail d'AlamarBlue™/CFDA-AM.
- j) Dans chaque puits, introduire 400 µL de la solution de travail de rouge neutre (**note** : faire couler l'indicateur coloré contre la paroi des puits et non directement sur les cellules, pour ne pas détacher les cellules du fond du puits).
- k) Couvrir la plaque avec son couvercle et incuber à 19 ± 1 °C pendant 60 minutes dans l'obscurité (p. ex., envelopper la plaque d'aluminium).
- l) Éliminer la solution de travail de rouge neutre.
- m) Laver soigneusement chaque puits avec 400 µL de solution de fixation (annexe 3) puis éliminer la solution de fixation (**note** : faire couler la solution de fixation contre la paroi des puits et non directement sur les cellules, pour ne pas détacher les cellules du fond du puits).
- n) Introduire dans chaque puits 400 µL de solution d'extraction (annexe 3), refermer le couvercle de la plaque et incuber sur un agitateur de plaques à faible vitesse pendant 10 minutes à température ambiante et dans l'obscurité (p. ex., envelopper la plaque d'aluminium).

- o) Mesurer la fluorescence du rouge neutre (longueurs d'onde fournies ci-dessous) à l'aide du lecteur de plaques en fluorescence.

Paramètres applicables au mesurage de la fluorescence :

Le mesurage porte sur les effets observés. Les indicateurs colorés fluorescents sont réputés dissous de façon homogène dans le milieu de mesure.

AlamarBlue™ : excitation : 530 nm émission : 595 nm

CFDA-AM : excitation : 493 nm émission : 541 nm

Rouge neutre : excitation : 530 nm émission : 645 nm

A4.6. Élimination des déchets

Éliminer les solutions de mesure, le surplus de solutions d'indicateurs colorés/de fixation/d'extraction, de solutions mères et de solutions d'exposition, ainsi que les plaques restantes, conformément aux normes du laboratoire.

A4.7. Calcul des résultats

On utilise les valeurs brutes de la fluorescence pour calculer la toxicité, exprimée en pourcentage de la viabilité cellulaire du témoin correspondant.

- Calculer la moyenne des valeurs de fluorescence des puits témoins sans cellules, puis soustraire cette moyenne aux valeurs de fluorescence de chaque autre puits (avec cellules) de la même plaque.
- Calculer, pour chaque puits tripliqué de chaque concentration de produit chimique d'essai, le pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au témoin correspondant.
- Ainsi, la moyenne des valeurs de fluorescence du témoin vaut 100 % (100 % des cellules sont viables) et la viabilité cellulaire dans chaque autre puits est calculée par rapport à cette référence.

$$\% \text{ viabilité cellulaire} = \frac{\text{unités fluo. produit chimique} \times 100 \%}{\text{unités fluo. témoin solvant}}$$

- Calculer la moyenne et l'écart-type du pourcentage de viabilité cellulaire pour chaque concentration de produit chimique d'essai et utiliser ces données pour interpréter la courbe concentration-réponse.
- Placer en abscisses, pour chaque concentration d'essai, la moyenne géométrique des concentrations mesurées au début (c_{0h}) et à la fin (c_{24h}) de l'essai. En ordonnées, représenter les pourcentages de viabilité cellulaire. Procéder à un ajustement de la courbe sigmoïde de concentration-réponse par

régression non linéaire avec des contraintes paramétrées sur Bas (0.0) et Haut (100.0), puis en déduire les valeurs de CE50, en appliquant un modèle logistique à quatre paramètres à pente variable, ou bien la méthode de vraisemblance de profil décrite par Raue et al. (2009).

A4.8. Critères de validité de l'essai

A4.8.1. Exclusion de l'autofluorescence

La différence de fluorescence entre les deux puits témoins sans cellules ne doit pas dépasser 20 %. Si une interférence est relevée (c.-à- d., une différence > 20 % entre le témoin sans cellules exposé et le témoin sans cellules traité par L-15/ex seul, paragraphes A4.2.1 et A4.5.4), une plaque témoin entièrement sans cellules doit être soumise à la méthode d'essai ; les valeurs de fond de fluorescence dépendantes de la concentration seront ensuite soustraites aux valeurs obtenues dans les puits avec cellules correspondants.

A4.8.2. Exclusion de toute contamination du témoin solvant organique

Afin d'exclure toute contamination du solvant organique utilisé, relever la viabilité cellulaire du témoin négatif (sans solvant) et du témoin solvant dans chaque plaque. La baisse de fluorescence brute dans le témoin solvant ne doit pas dépasser 10 % de la fluorescence observée dans le témoin négatif (paragraphe A4.2.1).

A4.8.3. Performance de l'essai (témoin positif)

Lors de chaque épreuve, il convient de tester une plaque distincte contenant une plage de concentrations du témoin positif, la 3,4-dichloroaniline. La valeur moyenne de CE50 obtenue pour chaque indicateur coloré aux concentrations nominales de 3,4-DCA ne doit pas dépasser une fourchette de 2.5 écarts-types (ET) de la CE50 obtenue lors de l'essai circulaire réalisé avec la 3,4-DCA (n = 27 ; Fischer et al., 2019).

AlamarBlue™ : 43.6 mg/L ± 6.1 mg/L (2.5 ET : 28.4 - 58.9 mg/L)

CFDA-AM : 62.5 mg/L ± 18.9 mg/L (2.5 ET : 15.2 - 109.8 mg/L)

Rouge neutre : 58.6 mg/L ± 18.6 mg/L (2.5 ET : 12.1 - 105.0 mg/L)

A4.9. Références de l'ANNEXE 4

Fischer M, Belanger SE, Berckmans P, Bernhard MJ, Bláha L, Coman Schmid DE, Dyer SD, Haupt T, Hermens JLM, Hultman MT, Laue H, Lillicrap A, mLnáříková M, Natsch A, Novák J, Sinnige TL, Tollefsen KE, von Niederhäusern V, Witters H, Županič A, Schirmer K. (2019). Repeatability and reproducibility of the RTgill-W1 cell line assay for predicting fish acute toxicity. *Toxicological Sciences*, 169(2): 353-364. doi: 10.1093/toxsci/kfz057

Raue A, Kreutz C, Maiwald T, Bachmann J, Schilling M, Klingmüller U, Timmer J. (2009). Structural and practical identifiability analysis of partially observed dynamical models by exploiting the profile likelihood. *Bioinformatics*, 25: 1923–1929. doi.org/10.1093/bioinformatics/btp358

O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17): 5421–5426. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x

ANNEXE 5 : Modèles de documentation de l'essai

PRÉPARATION DES SOLUTIONS MÈRES 10X entrant dans la composition du L-15/ex

Solution mère*	Substance chimique	Fournisseur** N° de lot	Conc. finale [g/L]	Quantité à ajouter	Masse réelle	Stérilisé ?
Solution saline A (600 mL)	NaCl		133.3	80.0 g		<input type="checkbox"/> autoclavé
	KCl		6.66	4.0 g		
	MgSO ₄		1.63	0.98 g		
	MgCl ₂		1.56	0.94 g		
	Eau déminéralisée		Compléter jusqu'à 600 mL		<input type="checkbox"/>	
Solution saline B (100 mL)	CaCl ₂		14.0	1.4 g		<input type="checkbox"/> autoclavé
	Eau déminéralisée		Compléter jusqu'à 100 mL		<input type="checkbox"/>	
Solution saline C (300 mL)	Na ₂ HPO ₄		6.33	1.9 g		<input type="checkbox"/> autoclavé
	KH ₂ PO ₄		2.0	0.6 g		
	Eau déminéralisée		Compléter jusqu'à 300 mL		<input type="checkbox"/>	
Solution de galactose (100 mL)	Galactose		90.0	9.0 g		<input type="checkbox"/> stérilisé par filtration (0.2 µm)
	Eau déminéralisée		Compléter jusqu'à 100 mL		<input type="checkbox"/>	
Solution de pyruvate (100 mL)	Pyruvate de sodium		55.0	5.5 g		<input type="checkbox"/> stérilisé par filtration (0.2 µm)
	Eau déminéralisée		Compléter jusqu'à 100 mL		<input type="checkbox"/>	

* Les solutions salines mères doivent être conservées à température ambiante, les solutions de galactose et de pyruvate doivent

être conservées au congélateur, pour une durée maximale de 6 mois.

** Indiquer le fournisseur et le numéro de catégorie s'ils diffèrent de ceux mentionnés dans le document-guide.

Date de préparation :	
Date d'expiration :	
Préparé par :	

Signature _____ de
l'opérateur :

Les informations relatives à la préparation des solutions mères entrant dans la composition du L-15/ex doivent être consignées dans le cahier de laboratoire et dans un dossier supplémentaire. Les solutions salines mères doivent être conservées à température ambiante, les solutions de galactose et de pyruvate doivent être conservées au congélateur, pour une durée maximale de 6 mois.

PRÉPARATION DU MILIEU L-15/ex* à partir des solutions 10X

Pour un volume final de 1000 mL dans un récipient stérile :

Substance chimique	Date de préparation	Volume à ajouter	Ajouté ?
Solution saline A		60 mL	<input type="checkbox"/>
Solution saline B		10 mL	<input type="checkbox"/>
Solution saline C		30 mL	<input type="checkbox"/>
Solution de galactose		10 mL	<input type="checkbox"/>
Solution de pyruvate		10 mL	<input type="checkbox"/>
Eau stérile		880 mL	<input type="checkbox"/>

* Le milieu L-15/ex doit être conservé à 19 ± 1 °C pour une durée maximale de 3 mois.

* Le pH et l'osmolalité du L-15/ex doivent être compris dans les intervalles 7-7.5 et 290-320 mmol/kg, respectivement.

Date de préparation :	
Date d'expiration :	
Préparé par :	

Signature de l'opérateur :

Les informations relatives à la préparation du milieu L-15/ex doivent être consignées dans le cahier de laboratoire et dans un dossier supplémentaire. Conserver le L-15/ex à 19 ± 1 °C pendant une durée maximale de 3 mois.

PRÉPARATION DES SOLUTIONS MÈRES DE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI DANS LE DMSO et DES SOLUTIONS D'EXPOSITION DANS LE L-15/ex

PRÉPARATION DES SOLUTIONS MÈRES DE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI DANS LE DMSO
SOLUTION MÈRE

Produit chimique d'essai	Fournisseur N° de lot	Concentration nominale	Masse initiale	DMSO ajouté ? Volume ?
				<input type="checkbox"/> mL

SÉRIE DE DILUTIONS dans le DMSO

Nom	Concentration [g/L]	Volume de DMSO [mL]	Vol. de solution ajouté [mL]	Facteur de dilution
Solution 1 (S1)		= solution mère		
Solution 2 (S2)			S1 :	
Solution 3 (S3)			S2 :	
Solution 4 (S4)			S3 :	
Solution 5 (S5)			S4 :	
Solution 6 (S6)			S5 :	
Solution 7 (S7)	0.0	= DMSO seul		

PRÉPARATION DES SOLUTIONS D'EXPOSITION DANS LE L-15/ex

Nom	Volume L-15/ex [mL]	Volume de solution mère ajouté [µL]		Conc. finale de produit chimique d'essai de la solution d'exposition [mg/L]
Concentration 1 (C1)	12	S1	60	
Concentration 2 (C2)	12	S2	60	
Concentration 3 (C3)	12	S3	60	
Concentration 4 (C4)	12	S4	60	
Concentration 5 (C5)	12	S5	60	
Concentration 6 (C6)	12	S6	60	
Témoin solvant (TS)	12	S7	60	0.0

Code d'identification de l'essai :	
Date de préparation :	

Signature _____ de
l'opérateur :

Les informations relatives à la préparation des solutions mères de produit chimique d'essai doivent être consignées dans le cahier de laboratoire et dans un dossier supplémentaire.

PRÉPARATION DE LA SOLUTION MÈRE DE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI DANS LE L-15/ex ET DES SOLUTIONS D'EXPOSITION DANS LE L-15/ex

PRÉPARATION DE LA SOLUTION MÈRE DE PRODUIT CHIMIQUE D'ESSAI DANS LE L-15/ex
SOLUTION MÈRE

Produit chimique d'essai	Fournisseur N° de lot	Concentration nominale	Masse initiale	L-15/ex ajouté ? Volume ?
				<input type="checkbox"/> mL

SÉRIE DE DILUTIONS dans le L-15/ex

Nom	Concentration [mg/L]	Volume de L-15/ex [mL]	Vol. de solution ajouté [mL]	Facteur de dilution
Concentration 1 (C1)		= solution mère		
Concentration 2 (C2)			C1 :	
Concentration 3 (C3)			C2 :	
Concentration 4 (C4)			C3 :	
Concentration 5 (C5)			C4 :	
Concentration 6 (C6)			C5 :	
Témoin négatif (TN)	0.0	= L-15/ex seul		

Code d'identification de l'essai :	
Date de préparation :	

Signature _____ de
l'opérateur :

Les informations relatives à la préparation de la solution mère de produit chimique d'essai et des séries de dilutions doivent être consignées dans le cahier de laboratoire et dans un dossier supplémentaire.

PRÉPARATION DES SOLUTIONS DE FIXATION ET D'EXTRACTION

Solution*	Substance chimique	Fournisseur** N° de lot	Conc. finale	Valeur nominale	Valeur réelle
Fixation (1 L)	CaCl ₂		5 g/L	5 g	
	Formaldéhyde 37 % (m/v)		0.25 %	6.75 mL	
	Eau			993 mL	
Extraction (1 L)	Acide acétique		1.0 %	10 mL	
	Éthanol		50 %	500 mL	
	Eau			490 mL	

* Conserver les solutions à température ambiante pendant une durée maximale de 6 mois.

** Indiquer le fournisseur et le No de catalogue s'ils diffèrent de ceux mentionnés dans le document-guide.

Date de préparation :	
Préparé par :	

Signature de l'opérateur :

Les informations relatives à la préparation des solutions de fixation et d'extraction doivent être consignées dans le cahier de laboratoire et dans un dossier supplémentaire. Conserver les solutions à température ambiante pendant une durée maximale de 6 mois.

SOLUTIONS UTILISÉES DANS L'ESSAI

Code d'identification de l'essai :		
Date de préparation du L-15/ex :		
PBS - Fournisseur*/N° de lot :		
Préparation des solutions de travail d'indicateur coloré** :		
Solution de travail :	alamarBlue™ + CFDA-AM	Rouge neutre
Fournisseur* : N° de lot :		
Concentration finale :	- 5 % (v/v) alamarBlue™ - 4 µM CFDA-AM	- 1.5 % (v/v)
Pour 12 mL de solution d'indicateur coloré :	- 600 µL alamarBlue™ - 12 µL CFDA-AM 4 mM dans le DMSO - 11.4 mL PBS	- 180 µL rouge neutre - 11.82 mL PBS
Volume nécessaire de solution d'indicateur coloré :	mL	mL
Volume nécessaire d'indicateur coloré :	alamarBlue™ : µL CFDA-AM : µL	Rouge neutre : µL
Volume nécessaire de PBS :	mL	mL
Date de préparation des solutions de travail d'indicateur coloré :		
* Indiquer le fournisseur et le n° de catalogue s'ils diffèrent de ceux mentionnés dans le document-guide. ** À conserver à température ambiante et dans l'obscurité pendant une durée maximale d'un jour.		
Date de préparation de la solution de fixation :		
Date de préparation de la solution d'extraction :		

Signature de l'opérateur :

Les solutions d'indicateur coloré doivent être préparées fraîches chaque jour. Si elles sont conservées à température ambiante et dans l'obscurité, elles restent utilisables

pendant toute une journée.

ANNEXE 6 : Culture des cellules RTgill-W1

On trouvera dans cette annexe les procédures de routine (repiquage, congélation et décongélation des cellules) applicables à la lignée cellulaire RTgill-W1.

A6.1. Mesures régulières à des fins d'assurance qualité

Consignation des informations : les informations concernant la décongélation, le repiquage (passage) et la congélation des cellules ainsi que la vérification d'absence de mycoplasmes doivent être consignées dans le cahier de laboratoire.

Vérification de l'absence de mycoplasmes : les lignées cellulaires permanentes sont souvent la cible de contaminations mycoplasmiques. Les mycoplasmes interfèrent avec le cycle et le métabolisme cellulaires, ce qui peut ensuite avoir une influence sur la sensibilité du test de viabilité cellulaire. Il convient donc de vérifier régulièrement (tous les trois mois) l'absence de contamination mycoplasmique dans les cultures. En cas de suspicion (aspect inhabituel des cultures au microscope ou changement de sensibilité du système d'essai, par exemple), il faut immédiatement tester les cultures cellulaires. Les cultures contaminées doivent être éliminées et remplacées par un nouveau lot de cellules fraîchement décongelées.

A6.2. Éléments de base applicables à la culture de cellules RTgill-W1

Les cellules RTgill-W1 sont adhérentes et forment des monocouches en culture. Les cultures cellulaires sont repiquées dans des flacons de culture, à 19 ± 1 °C, sans apport de CO₂ supplémentaire ni saturation hygrométrique.

Les cellules peuvent croître jusqu'à un niveau défini de confluence, c'est pourquoi elles doivent être repiquées régulièrement. Après 150 repiquages, les cellules doivent être éliminées et de nouvelles cellules ayant subi moins de repiquages doivent être décongelées.

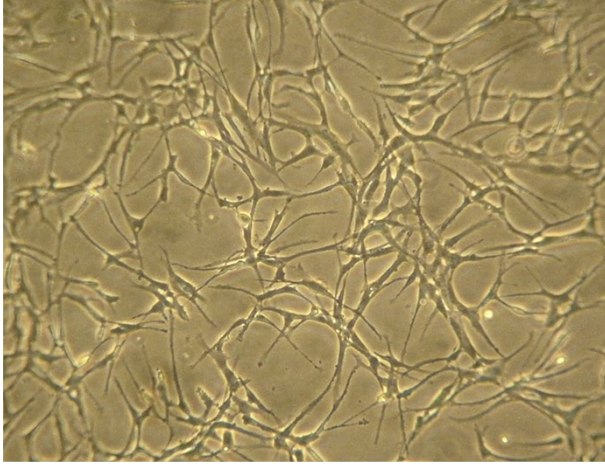
Le repiquage doit avoir lieu quand les cellules ont atteint 90-100 % de confluence, c.-à- d. quand la surface du flacon de culture est complètement recouverte. En général, on divise le contenu d'un flacon en deux nouveaux flacons. Dans ces conditions, il faut compter un passage tous les 10 à 12 jours.

Un aspect opaque et sale du milieu de culture ainsi que la mort/le détachement de cellules sont les principaux révélateurs de la présence de bactéries, moisissures ou levures. En cas de contamination, il faut éliminer immédiatement tous les flacons de culture contaminés ainsi que tous les milieux et solutions ouverts, et désinfecter intégralement le plan de travail conformément aux normes du laboratoire (p. ex. à l'éthanol ou à l'alcool isopropylique à 70 % (v/v)).

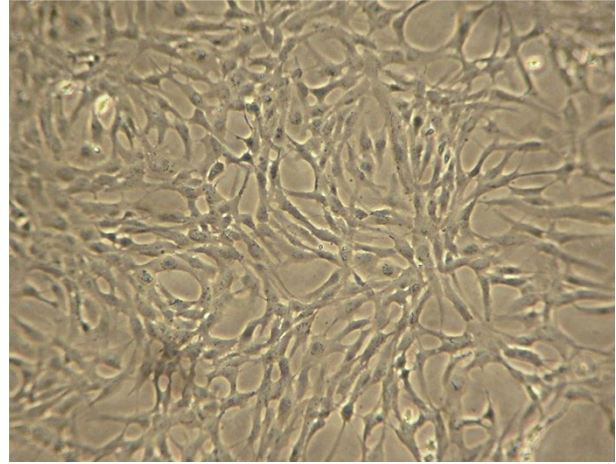
A6.3. Morphologie des cellules RTgill-W1

Les cellules présentent une forme irrégulière et allongée lorsque la densité cellulaire est faible,

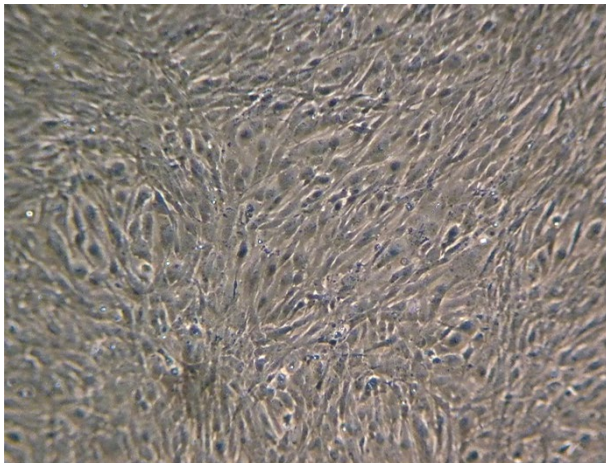
puis prennent une forme polygonale et constituent une couche compacte lorsqu'elles atteignent la confluence (graphique annexe 6-1 ; voir aussi Bols et al., 1994).



a)



b)



c)

graphique annexe 6-1 — Monocouches non confluentes (a, b) et confluentes (c) de cellules RTgill-W1 ; a) un jour, b) cinq jours, c) 12 jours après repiquage

A6.4. Appareillage et matériel de culture cellulaire

Les fournisseurs mentionnés le sont à titre d'exemple. L'appareillage et le matériel indiqués dans cette liste ont fait la preuve de leur fiabilité, cependant il est possible d'en utiliser d'autres.

	Appareillage et matériel	Exemple de fournisseur
1	Poste de sécurité biologique	HeraSafe ; Kendro
2	Incubateur	BK-700, (3 – 40 °C) ; Heraeus Instruments
3	Flacons de culture cellulaire	75 cm ² avec bouchon à vis ventilé 90075 ; TPP. Ne pas utiliser de bouchons à filtre pour fermer les flacons de culture ; l'utilisation de ces bouchons a déjà posé problème dans la culture de cellules RTgill-W1.
4	Pipettes en verre (stériles)	5 mL, 10 mL, 20 mL ; VWR
5	Pipettes Pasteur (stériles)	230 mm ; VWR
6	Pipeteur (auxiliaire de pipetage)	Pipetus-akku ; Hirschmann Laborgeräte
7	Boîtes de stérilisation pour pipettes	612-2089 ; VWR
8	Microscope	Axiovert 40C ; ZEISS
9	Pompe à vide	Mini-Vac eco ; Axonlab
10	Embouts de pipette (stériles)	10 µl, 1000 µl ; Socorex
11	Pipettes	10 µl, 1000 µl ; Socorex
12	Centrifugeuse	Heraeus Labofuge 400R (0 – 40 °C ; 17 – 3900 g) ; Thermo Science
13	Tubes en plastique à centrifuger (15 mL, stériles)	91015 ; TPP
14	Tubes en plastique à centrifuger (50 mL, stériles)	91050 ; TPP
15	Cryotubes	1.2 mL, 479-0802 ; VWR

A6.5. Réactifs, milieux et solutions de culture cellulaire

Les fournisseurs mentionnés le sont à titre d'exemple. On sait de longue date que les solutions listées produisent des résultats positifs, mais il est possible d'utiliser des solutions de qualité culture cellulaire d'autres fournisseurs, à condition que les concentrations/compositions finales des solutions utilisées pour repiquer les cultures soient similaires à celles fournies en exemple. Si le FBS d'un autre fournisseur est utilisé, il convient de tester sa compatibilité en effectuant trois repiquages des cellules cultivées dans un milieu de culture le contenant, et en observant la viabilité et la croissance cellulaires au microscope. Si le FBS est inefficace, la croissance

cellulaire ralentit, les cellules pouvant aller jusqu'à se détacher. Si le FBS est jugé efficace, il convient alors de commander plusieurs bouteilles du même lot pour s'assurer que le même sérum sera utilisé pendant toute la durée de l'essai.

A6.5.1 Solutions prêtes à l'emploi disponibles dans le commerce

	Exemple de fournisseur	Conditions de conservation
Sérum bovin (FBS)	CVFSVF00-01 (Eurobio) Note : ne pas inactiver le FBS à la chaleur [2]	Décongeler avant utilisation et préparer des aliquotes de 25 mL dans des tubes stériles adaptés. Conserver à -20 °C
Gentamicine	10 mg/mL p. ex. LONZ02-012E (Lonza) ou BCHRA2712 (Biochrom)	Conserver conformément aux recommandations du fabricant
Trypsine	0.25 % dans du PBS sans Ca ²⁺ sans Mg ²⁺ , L11-002 (PAA)	Décongeler avant utilisation et préparer des aliquotes de 10 mL dans des tubes stériles adaptés. Conserver à -20 °C
Versène (0.2 g/L EDTA dans du PBS)	1:5000, 15040 (Gibco)	Conserver à 4 °C
Milieu L-15 de Leibovitz	avec glutamine, sans rouge de phénol 21083 (Gibco)	Conserver à 4 °C
DMSO	Diméthylsulfoxyde, qualité biologie moléculaire, applicable aux cultures de cellules végétales, ≥ 99.9 %, D8418 ; Sigma-Aldrich	Conserver à température ambiante

A6.5.2 Solutions préparées en laboratoire

Milieu de culture L-15 complet : ajouter à 500 mL de L-15 :

25 mL de FBS

2.5 mL de solution de gentamicine (**Note** : l'usage d'antibiotiques, par exemple 0.5 % de gentamicine, est facultatif. Les laboratoires expérimentés peuvent procéder sans antibiotique.)

Conserver à 4 °C pendant une durée maximale de

Solution de congélation des cultures cellulaires : ajouter au milieu L-15 (froid, à 4 °C) p. ex.

10 % (v/v) de FBS +1 mL

10 % (v/v) de DMSO +1 mL

(si la solution est fraîchement préparée, la refroidir

A6.6. Préparation du matériel et des solutions de travail pour le repiquage

Décongeler la trypsine. Porter la trypsine, le versène et le milieu L-15 complet à 19 ± 1 °C dans un incubateur pendant au moins une heure avant de repiquer les cultures. Allumer le poste de sécurité microbiologique, désinfecter son plan de travail conformément aux procédures stériles du laboratoire et laisser l'air se renouveler pendant 10 à 15 minutes. Désinfecter les boîtes à pipettes (Pasteur et en verre), les bouteilles de trypsine, de versène et de milieu de culture L-15 complet, ainsi que les flacons de culture cellulaire conformément aux procédures stériles du laboratoire avant de les poser à l'intérieur du poste de sécurité microbiologique.

A6.7. Mode opératoire pour le repiquage

Le repiquage doit être effectué à température ambiante, donc rapidement, pour ne pas exposer les cellules à des températures trop élevées pendant trop longtemps. Ne pas repiquer des cellules si la température ambiante est ≥ 25 °C.

Mode opératoire pour un flacon de culture cellulaire :

- a) Au microscope, vérifier l'état de la culture cellulaire dans le flacon.
- b) Si la culture est confluente (graphique annexe 6-1c), préparer le repiquage comme suit.
- c) Aspirer le milieu de culture à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et d'une pompe à vide.
- d) Déposer délicatement 1 mL de versène (**note** : ne pas verser directement le versène sur les cellules, elles pourraient se détacher).
- e) Rincer les cellules en agitant délicatement le flacon de culture.
- f) Aspirer le versène et répéter les étapes de rinçage d), e), f).
- g) Après avoir enlevé le versène du deuxième rinçage, ajouter 0.7 mL de trypsine (**note** : après ajout de la trypsine, les cellules se détachent en général rapidement, en moins d'une minute. Il est donc recommandé de ne pas repiquer plus de huit flacons à la fois, afin d'éviter une trypsination trop longue, ce qui pourrait provoquer la digestion des cellules par la trypsine).
- h) Afin de faciliter la dissociation des cellules, tapoter et agiter délicatement le flacon de culture cellulaire (vérifier visuellement que les cellules se détachent).

- i) Ajouter 5 mL de milieu de culture L-15 complet pour interrompre l'action de la trypsine.
- j) Suspendre les paquets de cellules à la pipette ; pour détacher les cellules qui adhèrent encore à la surface du flacon, pipeter délicatement la solution plusieurs fois, par aspiration et refoulement, en recouvrant les cellules attachées (éviter à tout prix la formation de mousse, car les forces de cisaillement pourraient provoquer la rupture des cellules).
- k) Transférer la suspension de cellules dans un tube en plastique à centrifuger de 15 ou 50 mL.
- l) Centrifuger pendant 3 minutes à ≤ 875 g et à 18-21 °C.
- m) Éliminer autant de liquide surnageant que possible sans aspirer le culot de cellules.
- n) Suspendre le culot cellulaire dans 10 mL de milieu de culture L-15 complet et mélanger délicatement la suspension plusieurs fois à la pipette, par aspiration et refoulement ou contre la paroi du tube (éviter à tout prix la formation de mousse, car les forces de cisaillement pourraient provoquer la rupture des cellules).
- o) Répartir les cellules dans deux flacons de culture (les flacons peuvent être utilisés pour deux passages),
 - ↳ déposer 5 mL de suspension cellulaire dans chaque flacon de culture,
 - ↳ ajouter 5 mL de milieu de culture complet, pour un volume final de 10 mL,
 - ↳ refermer les flacons et incuber les cellules à 19 ± 1 °C dans l'obscurité.

Il convient de vérifier régulièrement (au minimum tous les trois jours) la morphologie des cellules et l'absence de contamination microbienne au microscope. De même, les températures minimum et maximum d'incubation doivent être vérifiées chaque jour ouvrable et tout écart supérieur à ± 1 °C doit être consigné. Repiquer les cellules environ tous les 10 à 12 jours et changer le milieu de culture 5 à 7 jours après chaque repiquage.

La procédure de repiquage décrite s'applique à un seul flacon de culture. Il est possible de repiquer plusieurs flacons en même temps, à condition que les cellules soient toutes issues du même passage. Dans ce cas, la quantité de versène et de trypsine par flacon reste inchangée. Le volume de milieu de culture L-15 complet utilisé pour arrêter la trypsination peut varier (il est par exemple possible de rassembler les cellules de quatre flacons dans 15 mL de milieu) ; il est également possible de mélanger des suspensions cellulaires issues de flacons ayant subi le même nombre de repiquages et de les centrifuger ensemble dans un seul tube. On peut également adapter le volume de milieu de culture L-15 complet employé pour suspendre le culot de cellules après centrifugation, à condition que les cellules soient divisées à 1:2 et que chaque nouveau flacon contienne 10 mL de milieu de culture à la fin de la procédure.

A6.8. Mode opératoire pour la congélation et la décongélation des cultures de RTgill-W1

Congélation :

- a) Pour une meilleure survie à la décongélation, il est recommandé de suspendre le culot de cellules dans un milieu de congélation froid puis de congeler rapidement les cellules.
- b) Préparer une solution de congélation fraîche (paragraphe A6.5.2) et la placer en attente à 4 ± 1 °C ou sur un baquet de glace.
- c) Étiqueter/nommer des cryotubes et les placer dans un portoir pré-refroidi ou posé sur de la glace.
- d) Utiliser des flacons de cultures confluentes.
- e) Récolter les cellules comme décrit au paragraphe A6.7, étapes a) à h).
- f) Après la trypsination, ajouter 5 mL de milieu de culture L-15 complet par flacon et suspendre les cellules en pipetant délicatement la solution plusieurs fois, par aspiration et refoulement, en recouvrant les cellules attachées.
- g) Centrifuger pendant 3 minutes à ≤ 875 g et à 18-21 °C.
- h) Éliminer le surnageant.
- i) Dissoudre le culot dans 1 mL de solution de congélation par flacon récolté et répartir des aliquotes de cellules dans les cryotubes pré-refroidis (1 mL par cryotube).
- j) Placer à -80 °C pendant au moins 24 h et au maximum 6 mois.
- k) Pour finir, idéalement après 24 h passées à -80 °C, conserver dans l'azote liquide (phase liquide ou vapeur).

Décongélation :

- a) Préparer un milieu de culture L-15 complet et le porter à 19 ± 1 °C.
- b) Extraire les cryotubes contenant les cellules congelées de l'azote liquide ou du congélateur à -80 °C.
- c) Décongeler rapidement les cellules au bain-marie tiède (~ 20 °C).

- d) Transférer délicatement les cellules dans un tube à centrifuger 15 mL.
- e) Ajouter délicatement et goutte à goutte 5 mL de milieu de culture L-15 complet tout en agitant lentement.
- f) Transférer la suspension cellulaire dans un flacon de culture à l'aide d'une pipette en verre (un flacon 75 cm² ou deux flacons 25 cm²) puis ajouter du milieu jusqu'à atteindre un volume final de 10 mL (flacon 75 cm²) ou 5 mL (flacon 25 cm²) de milieu.
- g) Placer les cellules à l'incubateur à 19 ± 1 °C.
- h) Changer le milieu au bout de 24 h.

Modèles de documentation :

PRÉPARATION DU MILIEU DE CULTURE L-15 COMPLET*

Pour un volume final de 527.5 mL :

Produit chimique	Fournisseur*** N° de lot	Concentration finale	Volume ajouter	à	Ajouté ?
Milieu L-15			500 mL		
FBS		4.7 %	25 mL		<input type="checkbox"/>
Gentamicine (10 mg/L)**		50 µg/L	2.5 mL		<input type="checkbox"/>

* Durée de conservation 3 mois à 4 °C.

** L'usage d'antibiotiques, par exemple 0.5 % de gentamicine, est facultatif. Les laboratoires expérimentés peuvent procéder sans antibiotique.

*** Indiquer le fournisseur et le n° de catalogue s'ils diffèrent de ceux mentionnés dans le document-guide.

Date de préparation :	
Date d'expiration :	
Préparé par :	

Signature _____ de
l'opérateur :

A.6.9. Références de l'ANNEXE 6

Bols NC, Barlian A, Chirinotrejo M, Caldwell SJ, Goegan P, Lee LEJ. (1994). Development of a Cell Line from Primary Cultures of Rainbow-Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Gills. *Journal of Fish Disease*, 17: 601-611.

Nims R.W. and Harbell J.W. (2017). Best practices for the use and evaluation of animal serum as a component of cell culture medium. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Animal*, 53: 682–690.

ANNEXE 7 : Modèle de rapport d'essai sur lignée cellulaire RTgill-W1

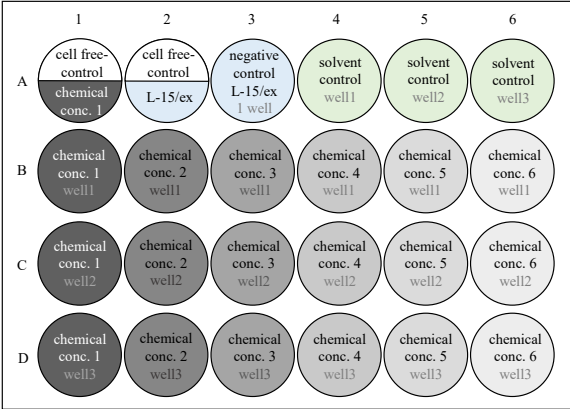
Date de l'essai :	
Code d'identification de l'essai :	

Informations relatives au produit soumis à l'essai :

Produit chimique d'essai :	
Fournisseur, n° de commande et n° de lot du produit chimique :	
Masse moléculaire :	
Pureté :	
K _{OE} :	
Pression de vapeur :	
pK _a :	
Hydrosolubilité :	
Constante de Henry (K _h) :	
Solvant organique utilisé dans la solution mère :	
Fournisseur, n° de commande, n° de lot, pureté du solvant :	
Plage de concentrations de l'essai (en mg/L) :	
Date de préparation des séries de dilution :	
Fournisseur, n° de commande, n° de lot, pureté de la 3,4-dichloroaniline :	

Informations relatives à l'essai :

Cellules RTgill-W1 utilisées : - nombre de repiquages - densité suspension cellulaire (cellules/mL) - calculs de l'ensemencement nécessaire (volume de suspension cellulaire/milieu de culture L-15 complet).	- - -
Échantillons soumis à analyse chimique : - méthode analytique : - limite de quantification : - pré-chargement en solvant nécessaire ? - échantillons prélevés en début d'essai (C _{0h}) :	

<p>- échantillons prélevés en fin d'essai (C_{24h}) :</p>	
<p>Plaques exposées au produit chimique d'essai conformément au plan de plaque (voir ci-dessous) :</p>	
<p>Température d'exposition :</p>	
<p>Observations :</p>	
<p>Plan de plaque défini (graphique 5 de la LD) :</p>	
<p>Programme et méthode utilisés pour calculer la valeur de CE50 :</p>	
<p>Courbes concentration-réponse :</p>	

<p>Valeurs de CE50 :</p>	<p>Résazurine</p> <p>Produit chimique d'essai CE50 [mg/L]</p> <p>Produit chimique d'essai Int. confiance à 95 % [mg/L]</p> <p>3,4-DCA CE50 [mg/L]</p> <p>3,4-DCA Int. confiance à 95 % [mg/L]</p>	<p>CFDA-AM</p>	<p>Rouge neutre</p>
<p>Validité de l'épreuve au regard des critères (cocher si valide) :</p>	<p>Différence de fluorescence entre les témoins sans cellules < 20 % (paragraphe 17a de la LD)</p> <p>Le % viabilité cellulaire du témoin solvant n'est pas inférieur de strictement plus de 10 % au % du témoin négatif (paragraphe 17b de la LD).</p> <p>La CE50 du témoin positif est comprise dans la plage d'acceptabilité (paragraphe 17c de la LD).</p>	<p>Colorant contenant la résazurine</p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p>	<p>CFDA-AM</p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p>Rouge neutre</p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/></p>
<p>Date :</p>	<p>Signature de l'opérateur :</p>		