

*LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE  
PRODUITS CHIMIQUES***Détermination de la clairance intrinsèque in vitro sur la fraction subcellulaire  
S9 du foie de truite arc-en-ciel (RT-S9)****INTRODUCTION**

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

© OCDE (2018)

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

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

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

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

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

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

## REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

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

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

11. La durée totale d'incubation ne doit pas dépasser 2 h, en raison de la perte progressive d'activité enzymatique de la fraction RT-S9. Cependant, des durées d'incubation supérieures (jusqu'à 4 h maximum) peuvent être envisagées pour des produits chimiques dont la biotransformation est très lente. Cela limite l'usage du test pour les produits chimiques dont la métabolisation est très lente. La vitesse la plus basse d'activité *in vitro* qui puisse être quantifiée de façon fiable correspond à une constante de vitesse d'élimination ( $k_e$ ) de premier ordre d'environ 0.05 h<sup>-1</sup> à 0.14 h<sup>-1</sup> (Nichols et al., 2013 ; Chen et al., 2016). Pour plus de précisions, voir le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 (OCDE, 2018a).

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

13. Pour les produits chimiques volatils et d'autres produits difficiles à tester, plusieurs méthodes alternatives sont proposées dans le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 (OCDE, 2018a), telles que l'utilisation de flacons d'incubation hermétiquement clos (flacons pour GC avec septum, par exemple) dans le cas des produits volatils, et l'utilisation de tubes à essai avec insert en verre ou le dosage passif pour les produits chimiques très peu solubles. Une configuration d'essai alternative est en outre présentée à l'annexe 6 (configuration d'essai 2).

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

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

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

17. Des fractions subcellulaires S9 du foie de poissons d'autres espèces que la truite arc-en-ciel peuvent être utilisées, à condition qu'elles puissent être préparées de façon appropriée et que les protocoles soient adaptés aux spécificités de chaque espèce (OCDE, 2018a).

## FONDEMENT SCIENTIFIQUE DE LA MÉTHODE

18. La fraction subcellulaire S9 du foie de la truite arc-en-ciel est relativement facile à préparer et à utiliser (Johanning et al., 2012 ; annexe 2). À l'état congelé ( $-80^\circ\text{C}$ ), les échantillons peuvent être transportés et stockés pendant deux ans au moins. De plus, il est possible d'utiliser le même lot de RT-S9 pour plusieurs essais séparés dans le temps.

19. La fraction RT-S9 contient des enzymes responsables de la biotransformation de phase I (cytochrome P450 (CYP), notamment) et de phase II (sulfotransférases (SULT), uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransférases (UGT), glutathion-transférases (GST), notamment) (Ekins et al., 1999).

## PRINCIPE DE L'ESSAI

20. La détermination de la CL, IN VITRO, INT du produit chimique testé est basée sur la déplétion du substrat. Le système d'incubation est constitué de RT-S9 et d'un tampon phosphate de potassium supplémenté en cofacteurs enzymatiques et en

alaméthicine destinés à favoriser les biotransformations de phase I et II. La réaction est déclenchée par l'addition du produit chimique testé. Pour collecter des échantillons à différents points dans le temps, on arrête la réaction en transférant des aliquotes de la suspension dans une solution d'arrêt. La diminution de la concentration de produit chimique testé dans les échantillons provenant du flacon d'incubation est mesurée par une méthode analytique validée (cf. § 22) et utilisée pour déterminer la CL, IN VITRO, INT. Des incubations utilisant de la RT-S9 enzymatiquement inactive sont réalisées comme témoin négatif permettant de faire la distinction entre la biotransformation enzymatique et la réduction abiotique.

## INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE TESTÉ

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

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

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

## PRODUIT CHIMIQUE DE RÉFÉRENCE ET TEST DE COMPÉTENCE

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

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

## VALIDITÉ DE L'ESSAI

25. Les critères de validité de l'essai sont les suivants :
- Les lots de RT-S9 doivent être évalués selon leur capacité à catalyser les réactions enzymatiques métaboliques de phases I et II, conformément aux indications de l'annexe 3 ;
  - La concentration de protéines des lots de RT-S9 doit être établie (voir l'annexe 2). Les concentrations de substrat (produit chimique testé) et de protéines doivent être établies lors d'essais préliminaires réalisant une cinétique de premier ordre, conformément aux indications de l'annexe 5. La concentration de protéines dans le mélange d'incubation final peut se situer entre 0.25 et 2 mg/mL, la valeur la plus couramment utilisée étant 1 mg/mL ;
  - Les témoins négatifs (RT-S9 enzymatiquement inactive) ne doivent présenter aucune perte significative de produit chimique parent sur la durée de l'incubation (pertes < 20 % des pertes observées dans les incubations de RT-S9 enzymatiquement active). De plus, les témoins négatifs ne doivent pas présenter d'augmentation sensible (> 20 %) du produit chimique parent sur la durée de l'incubation ;
  - Un minimum de six points dans le temps doit être utilisé pour déterminer la CL, IN VITRO, INT, c'est-à-dire établir l'équation de régression et calculer la pente, avec une valeur de  $R^2 \geq 0.85$ . Dans le cas des produits chimiques à métabolisation lente (donnant une pente très peu marquée, par exemple),  $R^2$  peut être < 0.85. Il convient alors d'évaluer dans quelle mesure la pente est significativement différente de zéro, avant d'inclure ou d'exclure l'épreuve ;
  - Un minimum de deux épreuves indépendantes doit être réalisé (cf. § 35). Si l'analyse de régression donne des résultats significativement différents à l'issue des deux épreuves avec RT-S9 active (test t des pentes pour  $p < 0.05$ , par exemple), une troisième épreuve doit être réalisée pour obtenir deux épreuves concluantes.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

### *Appareillage*

26. L'appareillage nécessaire est le suivant :
- Réfrigérateur à 4 °C
  - Congélateur à -20 °C
  - Congélateur à -80 °C
  - Balance analytique pour peser les réactifs, les cofacteurs et les produits chimiques testés
  - pH-mètre
  - Agitateur vortex
  - Centrifugeuse réfrigérée pour tubes de microcentrifugation (ou tubes utilisés dans les méthodes alternatives) à l'étape d'incubation et/ou d'arrêt de la réaction

- Équipement pour l'incubation des échantillons, par exemple bain-marie à agitation avec dispositif de refroidissement, incubateur à agitation avec fonctions de chauffage et de refroidissement, ou mélangeur thermorégulé avec fonctions d'agitation
- Verrerie pour la préparation des solutions, réactifs, etc.
- Flacons de verre pour test d'incubation (tubes à essai à scintillation de 7 mL, par exemple)
- Tubes de microcentrifugation de 1.5 mL
- Fioles à échantillons en verre pour HPLC/GC ou d'autres techniques d'analyse ;
- Pipettes et embouts.

#### *Cofacteurs, produits chimiques pour la préparation des réactifs*

27. Les produits suivants (qualité analytique ou équivalente) sont nécessaires :

- Nicotinamide adénine dinucléotide 2'-phosphate, sel tétrasodique (NADPH)
- Acide uridine 5'-diphosphoglucuronique, sel trisodique (UDPGA)
- L-glutathion réduit (GSH)
- Adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate, sel de lithium hydraté (PAPS)
- Alaméthicine de *Trichoderma viride*
- Phosphate de potassium dibasique (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)
- Phosphate de potassium monobasique (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

#### *Produits chimiques pour les mesures analytiques*

28. Les produits chimiques suivants sont nécessaires :

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

#### *Fraction RT-S9*

29. La fraction RT-S9 peut provenir d'éventuelles sources commerciales ou être préparée selon le protocole présenté à titre d'exemple à l'annexe 2.

30. La concentration de protéines de chaque lot de RT-S9 doit être établie (cf. annexe 2) et chaque lot de RT-S9 doit être évalué selon sa capacité à catalyser les réactions de biotransformation de phases I et II. Des tests standardisés de détermination de l'activité enzymatique de phases I et II sont présentés brièvement à l'annexe 3. Ces tests de caractérisation, ou des produits de référence connus, seront utilisés pour tester un nouveau lot de RT-S9 au début de l'essai ou avant la première utilisation du lot. Ils seront également utilisés ponctuellement pour suivre d'éventuelles pertes d'activité lors du stockage.

31. L'inclusion de RT-S9 enzymatiquement inactive (inactivée à la chaleur, par exemple) est obligatoire. Les incubations de RT-S9 enzymatiquement inactive servent de témoin négatif permettant de distinguer la biotransformation enzymatique de la réduction abiotique par adsorption sur le flacon d'incubation, volatilisation ou dégradation abiotique (pour plus de précisions, voir le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 ; [OCDE, 2018a]). L'annexe 4 comporte un protocole d'inactivation enzymatique par chauffage.

### *Configuration de l'essai*

32. Des essais préliminaires visant notamment à déterminer les plages de valeurs applicables (concentration de substrat, concentration de protéines et durée d'incubation, notamment) doivent être conduits afin d'établir les conditions d'incubation requises pour une mesure fiable de la clairance hépatique intrinsèque in vitro du produit chimique testé. L'annexe 5 précise comment déterminer les conditions donnant une cinétique de déplétion de premier ordre.

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

34. Un exemple de configuration d'essai utilisant un seul flacon avec sept points dans le temps est présenté à la figure 1 de l'annexe 6. Cette configuration est recommandée pour l'essai des produits chimiques ne présentant pas de difficulté particulière (produits non volatils, n'adhérant pas aux parois des récipients et se distribuant rapidement dans le système d'incubation, par exemple) à une concentration d'essai. C'est la configuration qui procure généralement les résultats les moins variables, et la plus simple à réaliser. Pour les produits chimiques volatils ou très hydrophobes, l'utilisation de plusieurs flacons est recommandée (annexe 6, figure 2).

35. Chaque essai comporte au moins deux épreuves indépendantes de détermination de la CL, IN VITRO, IN. Les épreuves indépendantes se déroulent des jours distincts, ou le même jour à condition que pour chaque épreuve : a) les solutions du produit chimique testé (solutions-mères et solutions de travail fraîches) soient préparées indépendamment et b) la RT-S9 utilisée soit décongelée indépendamment ; toutefois, la RT-S9 peut provenir du même lot. Si l'analyse de régression donne des résultats significativement différents pour les deux épreuves avec RT-S9 active (test t des pentes pour  $p < 0.05$ , par exemple), une troisième épreuve est réalisée pour obtenir deux épreuves concluantes.

36. Pour chaque épreuve, un flacon de RT-S9 active et un flacon de RT-S9 enzymatiquement inactive est additionné du produit chimique testé, et un flacon de RT-S9 active est additionné d'un produit chimique de référence. Des échantillons sont collectés à chaque point dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90 et 120 min, par exemple). Dans certains cas, des flacons supplémentaires (duplicats pour chaque flacon, par exemple) peuvent être nécessaires pour s'assurer de l'exactitude de la méthode analytique pour le produit chimique testé. Pour les incubations de RT-S9 enzymatiquement inactive, le nombre de points dans le temps peut être réduit si les résultats des essais préliminaires le justifient (annexe 5).

37. Les paragraphes suivants décrivent la conduite de l'essai lorsqu'un seul flacon est utilisé ; la configuration à plusieurs flacons est décrite à l'annexe 6.

### *Préparation du produit chimique testé, des tampons, des cofacteurs et de la solution d'arrêt*

38. Une ou plusieurs solutions-mères du produit chimique testé sont préparées dans un tampon phosphate de potassium (annexe 7) ou dans un solvant adéquat préalablement testé. Les solvants classiques sont par exemple l'acétone, l'acétonitrile ou le méthanol. La stabilité du produit chimique testé dans la solution-mère doit être évaluée préalablement à l'essai, si les solutions-mères ne sont pas fraîchement préparées (OCDE, 2018a – Section 3.2).

39. Le jour de l'essai, la concentration souhaitée pour l'introduction du produit chimique testé dans les flacons est préparée par dilution de la solution-mère dans un tampon phosphate de potassium (annexe 7) ou dans un solvant organique, selon les résultats des essais préliminaires (cf. § 25 ; annexe 5 ; OCDE, 2018a). Si un solvant organique est utilisé, la quantité totale de solvant dans le mélange d'incubation doit être maintenue aussi faible que possible et ne doit pas dépasser 1 % afin d'éviter une inhibition de l'activité enzymatique. Il convient de noter que la solution d'alaméthicine contient une proportion significative de solvant organique qui contribue à la concentration finale de solvant (0.25 %). En règle générale, la concentration d'essai doit être environ 10 fois plus élevée que la Ldq de la méthode analytique, tant que cela se traduit par une cinétique de premier ordre, d'après les résultats des essais préliminaires (§ 25 ; annexe 5).

40. L'annexe 7 décrit la préparation des tampons, des cofacteurs et des solutions d'alaméthicine utilisés. Les solutions-mères peuvent être préparées à l'avance, un jour avant l'essai, par exemple, mais les solutions introduites dans les flacons doivent être préparées le jour de l'essai.

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

### *Préparation de la fraction RT-S9 et des mélanges d'incubation*

42. Des volumes suffisants de RT-S9 active et de RT-S9 enzymatiquement inactive sont décongelés et dilués dans un tampon phosphate de potassium (voir l'annexe 7) jusqu'à une concentration de protéines 10 fois supérieure (10 mg/mL, par exemple) à la concentration de protéines dans le mélange d'incubation final (1 mg/mL, par exemple). L'annexe 7 donne un exemple de calcul. La RT-S9 active doit être décongelée dans un bain d'eau glacée. Un excédent de volume de 25-30 %, par exemple, est recommandé pour disposer d'un léger excès de matériel biologique, tant pour la RT-S9 active que pour la RT-S9 enzymatiquement inactive. Ainsi, pour disposer de 300 µL de RT-S9 active diluée et de 300 µL de RT-S9 inactive diluée, on préparera environ 400 µL de chaque.

43. Dans la configuration à un seul flacon, illustrée à la figure 1 de l'annexe 6, deux flacons de RT-S9 active et un flacon de RT-S9 enzymatiquement inactive sont utilisés, en tenant compte du nombre de points dans le temps prévus lors de l'essai. Nota : un excès



de RT-S9 active ne doit pas être recongelé en vue d'une utilisation ultérieure dans des tests de déplétion, mais peut être utilisé pour la préparation de RT-S9 enzymatiquement inactive. Un excès de RT-S9 inactive peut être recongelé pour un usage ultérieur.

44. Les flacons d'incubation sont préparés avec 400 µL de tampon phosphate de potassium au pH de 7.8 (cf. annexe 7) dans chacun des trois flacons. La RT-S9 diluée, active ou enzymatiquement inactive (100 µL de chaque), est ajoutée aux flacons d'incubation correspondants. Puis 100 µL de la solution de travail d'alaméthicine (250 µg/mL) sont ajoutés à chacun des flacons d'incubation, et les flacons sont pré-incubés sur la glace pendant 15 min.

45. Un master mix de cofacteurs (NADPH, UDPGA, GSH et PAPS) est préparé selon les indications de l'annexe 7. Le master mix est mélangé avec soin et stocké sur de la glace le moins longtemps possible avant addition au mélange de RT-S9. Le PAPS se dégrade rapidement et doit donc être préparé durant la pré-incubation avec l'alaméthicine, et ajouté juste avant l'étape du § 46.

46. 400 µL du master mix de cofacteurs sont ajoutés à chacun des flacons pré-incubés sur de la glace. Faire tourner doucement chaque flacon jusqu'au mélange complet. On se reportera à la figure 1 de l'annexe 7 pour plus de précisions sur les constituants du mélange d'incubation.

47. Les flacons d'incubation de RT-S9 active et enzymatiquement inactive sont placés dans un bain-marie ou un incubateur à agitation, et pré-incubés à  $11 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 10 minutes sous agitation douce.

#### *Incubation avec le produit chimique testé et arrêt de la réaction*

48. Le produit chimique testé (5 µL, en règle générale, mais cela dépend de la concentration de la solution d'ajout) est ajouté directement au mélange d'incubation de chaque flacon (généralement 1 mL) pour déclencher la réaction. Faire tourner les flacons pour répartir le produit chimique et les fermer sans serrer le bouchon.

49. Pour l'échantillonnage à un point donné dans le temps, retirer le flacon d'incubation du bain-marie ou de l'incubateur, le faire tourner ou l'agiter délicatement, prélever avec une pipette une aliquote (100 µL, par exemple) et l'introduire directement dans le tube de microcentrifugation de 1.5 mL correspondant contenant la solution d'arrêt glacée, conservée sur de la glace (cf. § 41). Pour garantir le transfert quantitatif de l'échantillon, il est recommandé de remplir et vider trois fois la pipette dans le solvant.

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

51. Une fois tous les échantillons prélevés ou, dans le cas des solvants volatils, à chaque échantillonnage, les tubes de microcentrifugation sont vortexés (pendant 3 min à 1 500-2 000 tr/min, par exemple) et centrifugés (5 min à 20 000  $\times$  g et  $4^\circ\text{C}$ , par exemple). Si, lors des essais préliminaires, la récupération du produit chimique testé est faible, il peut être nécessaire de prolonger l'agitation au vortex (jusqu'à 10 min, par

exemple). Pour certains produits chimiques d'essai, une nuit de réfrigération peut être nécessaire pour obtenir une extraction maximale par le solvant. Pour plus de précisions, consulter le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 – Section 3.3 (OCDE, 2018a). Le surnageant est transféré dans des fioles à échantillons pour HPLC/GC et stocké à  $-20 \pm 1^\circ\text{C}$  jusqu'à l'analyse.

## MESURES ANALYTIQUES

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

53. Toute la procédure reposant essentiellement sur l'exactitude, la précision et la sensibilité de la méthode analytique utilisée pour le produit chimique testé, il convient de vérifier expérimentalement l'exactitude, la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que le taux de récupération (80-120 %) du produit chimique testé dans le mélange d'incubation.

## DÉTERMINATION DE LA CLAIRANCE INTRINSÈQUE IN VITRO

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

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

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

57. Une constante de vitesse d'élimination de premier ordre,  $k_e$  (h<sup>-1</sup>), est établie : elle est égale à  $-2.3 \times$  pente de la décroissance log-linéaire.

58. En divisant  $k_e$  par la concentration de protéines mesurée, on obtient la CL, IN VITRO, INT (mL/h/mg de protéines).

## RAPPORT D'ESSAI

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

*Produit chimique testé*

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

*RT-S9*

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

*Conditions d'essai*

- Concentration du produit chimique testé et du produit chimique de référence
- Méthode de préparation des solutions-mères du produit chimique testé et du produit chimique de référence (nom et concentration du solvant, s'il y a lieu)
- Préparation et composition des réactifs
- Préparation et composition du mélange d'incubation
- Température d'incubation
- Quantité de protéines dans le mélange d'incubation
- Configuration de l'essai : méthode d'incubation (utilisation d'un seul flacon ou de plusieurs flacons)
- Nombre de réplicats (en cas d'utilisation de plusieurs réplicats par épreuve)
- Nombre d'épreuves indépendantes

- Points dans le temps
- Description des essais préliminaires

#### *Méthode analytique*

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

#### *Méthode statistique*

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

#### *Résultats*

- Résultats de tous les essais préliminaires effectués
- Données relatives à chaque flacon et point dans le temps pour chaque épreuve indépendante (notamment : produit chimique testé, produit chimique de référence, RT-S9 active et enzymatiquement inactive)
- S'ils sont mesurés, présence de métabolites formés (y compris, à titre facultatif : identification des métabolites et voies métaboliques)
- CL, IN VITRO, INT calculée pour chaque incubation indépendante avec fraction RT-S9 active et enzymatiquement inactive (produit chimique testé et produit chimique de référence, s'il y a lieu)
- Moyennes et écarts types des épreuves indépendantes, et résultats des tests t de comparaison des CL, IN VITRO, INT moyennes des épreuves non significativement différentes ;
- Points dans le temps ou épreuves exclus
- toute anomalie observée au cours de l'essai, tout écart par rapport à la Ligne directrice et toute autre information pertinente.

## References

- Brinkmann, M. et al. (2016), Cross-species extrapolation of uptake and disposition of neutral organic chemicals in fish using a multispecies physiologically-based toxicokinetic model framework, *Environmental Science & Technology* 50: 1914-23.
- Chen, Y. et al. (2016), Which molecular features affect the intrinsic hepatic clearance rate of ionizable organic chemicals in fish?, *Environmental Science & Technology* 50: 12722-12731.
- Cowan-Ellsberry, C.E et al. (2008), Approach for extrapolating in vitro metabolism data to refine bioconcentration factor estimates, *Chemosphere* 70:1804-1817.
- Dyer et al. (2008), In vitro biotransformation of surfactants in fish. Part I: Linear alkylbenzene sulfonate (C12-LAS) and alcohol ethoxylate (C13EO8), *Chemosphere* 72:850-862.

- Dyer et al. (2009), In vitro biotransformation of surfactants in fish. Part II: Alcohol ethoxylate (C13EO8) and alcohol ethoxylate sulfate (C14EO2S) to estimate bioconcentration potential, *Chemosphere* 76:989-998.
- ECHA (2017), Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment, Chapter R.7c: Endpoint specific guidance, Version 3.0.
- Ekins, et al. (1999), In vitro metabolism: sub-cellular fractions. In *Handbook of drug metabolism*, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel, pp 363-399.
- Fay, K.A et al. (2014a), Optimizing the use of rainbow trout hepatocytes for bioaccumulation assessments with fish, *Xenobiotica* 44:345-351.
- Fay, K.A, et al. (2014b), Intra- and interlaboratory reliability of a cryopreserved trout hepatocyte assay for the prediction of chemical bioaccumulation potential, *Environmental Science & Technology* 48:8170-8178.
- Halder, M., Lostia, A., Kienzler, A. (2018), EURL ECVAM Fish In Vitro Intrinsic Clearance Database, European Commission, Joint Research Centre (JRC) [Dataset] PID: <http://data.europa.eu/89h/jrc-eurl-ecvam-fish-in-vitro-intr-clear-db>.
- Han, X. et al. (2007), Determination of xenobiotic intrinsic clearance in freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat and its application in bioaccumulation assessment, *Environmental Science & Technology* 41:3269-3276.
- Johanning, K. et al. (2012), Assessment of metabolic stability using the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fraction, *Current Protocols in Toxicology* 53:14.10.1-28.
- Laue, H. et al. (2014), Predicting the bioconcentration of fragrance ingredients by rainbow trout using measured rates of in vitro intrinsic clearance, *Environmental Science & Technology* 48:9486-9495.
- Mingoia, R.T. et al.(2010), cryopreserved hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A validation study to support their application in bioaccumulation assessment, *Environmental Science & Technology* 44:3052-3058.
- Nichols, J.W. et al. (2013), Towards improved models for predicting bioconcentration of well-metabolized compounds by rainbow trout using measured rates of in vitro intrinsic clearance, *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 1611-1622.
- Nichols, J.W., Schultz, I.R., and Fitzsimmons, P.N. (2006), In vitro-in vivo extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish: I. A review of methods, and strategies for incorporating intrinsic clearance estimates into chemical kinetic models, *Aquatic Toxicology* 78:74-90.
- OECD (1992), Test No. 301: Ready Biodegradability, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070349-en>.
- OECD (1995a), Test No. 105: Water Solubility, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069589-en>.
- OECD (1995b), Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069626-en>.
- OECD (2004a), Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069824-en>.
- OECD (2004b), Test No. 111: Hydrolysis as a Function of pH, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069701-en>.

- OECD (2006a), Test No. 123: Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264015845-en>.
- OECD (2006b), Test No. 104: Vapour Pressure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264069565-en>.
- OECD (2006c), Test No. 310: Ready Biodegradability - CO<sub>2</sub> in sealed vessels (Headspace Test), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264016316-en>.
- OECD (2006d), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OECD Publishing, Paris, <http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono%282006%2918>.
- OECD (2014), Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Methods – Guidance used in Support of Pre-and-Post-Registration Data Requirements for Plant Protection and Biocidal Products, Series on Testing and Assessment No 204. ENV Publications, OECD, Paris, [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2014\)20&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2014)20&doclanguage=en).
- OECD (2018a), Guidance Document on the Determination of in vitro intrinsic clearance using cryopreserved hepatocytes (RT-HEP) or liver S9 sub-cellular fractions (RT-S9) from rainbow trout and extrapolation to in vivo intrinsic clearance, Series on Testing and Assessment No. 280, OECD Publishing, Paris.
- OECD (2018b), Test Guideline No.319A: Determination of in vitro intrinsic clearance using cryopreserved rainbow trout hepatocytes (RT-HEP), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris.
- OECD (2018c), Multi-laboratory ring trial to support development of OECD test guidelines on determination of in vitro intrinsic clearance using cryopreserved rainbow trout hepatocytes and liver S9 sub-cellular fractions, Series on Testing and Assessment No. 281, OECD Publishing, Paris.
- Stadnicka-Michalak, J., Tanneberger, K., Schirmer, K., and Ashauer, R. (2014), Measured and modeled toxicokinetics in cultured fish cells and application to in vitro-in vivo toxicity extrapolation, PLoS One. 9, e92303.

## ANNEXE 1

## Abréviations &amp; définitions

BCF	Facteur de bioconcentration (L/kg)
Cinétique de déplétion de premier ordre	Réaction chimique dans laquelle la vitesse de décroissance du nombre de molécules d'un substrat est proportionnelle à la concentration de molécules de substrat restantes
CL, IN VITRO, INT	Clairance intrinsèque in vitro (mL/h/10 <sup>6</sup> cellules ou mL/h/mg de protéines)
CYP	Cytochrome P450
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EROD	Éthoxyrésorufine-O-dééthylase
Fraction subcellulaire S9	Fraction surnageante d'un homogénat d'organe (le foie, généralement) obtenue par centrifugation à 9000 x g pendant 20 minutes dans un milieu approprié ; cette fraction contient du cytosol et des microsomes ; nota : chez le poisson, la fraction S9 est obtenue par centrifugation à 13 000 x g
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GSH	L-Glutathion
IGS	Indice gonado-somatique
GST	Glutathion transférase
HBSS	Solution saline équilibrée de Hank
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
ke	Constante de vitesse d'élimination (h <sup>-1</sup> )
Kow	Coefficient de partage n-octanol/eau
KM	Constante de Michaelis-Menten
LD	Ligne directrice
Ldq	Limite de quantification
Modèle IVIVE	Modèle d'extrapolation in vitro - in vivo
MS-222	Méthanesulfonate de tricaine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide 2'-phosphate

PAPS	Adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate
pKa	Constante de dissociation d'un acide ou Constante d'acidité
RT-S9	Fraction subcellulaire S9 du foie de truite arc-en-ciel
SULT	Sulfotransférase
tr/min	Tours par minute
UDPGA	Acide uridine 5'-diphosphoglucuronique
UGT	Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransférase
Vmax	Vitesse maximale de la réaction enzymatique à concentration saturante de produit chimique testé



## ANNEXE 2

### Exemple de protocole pour la préparation de la fraction subcellulaire S9 du foie de truite arc-en-ciel (RT-S9)

*NOTA : la fraction RT-S9 peut provenir d'éventuelles sources commerciales ou être préparée selon le protocole présenté à titre d'exemple dans la présente annexe. Ce protocole est adapté d'un protocole publié (Johanning et al., 2012) et a été utilisé lors de l'essai circulaire (OCDE, 2018).*

#### **Poissons**

1. La fraction RT-S9 doit provenir de truites arc-en-ciel sexuellement immatures, une étude antérieure ayant montré que chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) sexuellement immature, les capacités métaboliques ne présentent pas de différences liées au sexe (Johanning et al., 2012, 2010 ; Fay et al., 2014). La RT-S9 peut donc être recueillie sans tenir compte du sexe.
2. Si les poissons proviennent d'un fournisseur, ils doivent être acclimatés au laboratoire pendant 2 semaines au moins avant utilisation. Les poissons ne doivent pas recevoir de traitement contre une maladie durant la période d'acclimatation de deux semaines et, dans la mesure du possible, le fournisseur doit avoir complètement évité de leur en administrer un. Les poissons présentant des signes cliniques de maladies ne doivent pas être utilisés.
3. Les truites arc-en-ciel sont généralement élevées à 10-15 °C. La température de l'aquarium utilisé au laboratoire doit être similaire, et maintenue à  $\pm 2$  °C. La densité de poissons doit être suffisamment basse pour assurer des conditions optimales de développement et de bien-être.
4. Les caractéristiques chimiques de l'eau doivent être mesurées et consignées à intervalles réguliers, en particulier le pH, l'alcalinité totale (en mg/L de CaCO<sub>3</sub>), l'oxygène dissous (mg/L, converti en pourcentage de saturation) et l'ammoniac total (mg/L) (tableau 2).
5. On consignera également des données précises sur le maintien des poissons, et notamment : photopériode, régime alimentaire, type d'aliments, température de l'eau, densité d'animaux (kg de poissons/litre dans l'aquarium) et nombre de poissons/aquarium (tableau 2). Ces informations spécifiques doivent être consignées afin de permettre l'utilisation de paramètres relatifs à l'isolement dans des applications ultérieures telles que les modèles de prédiction des BCF.

#### **Résumé de la procédure**

6. Il est vivement recommandé d'utiliser du tissu hépatique frais pour préparer la fraction S9. Des travaux antérieurs ont montré que la congélation et la décongélation du tissu hépatique des poissons réduisait l'activité des enzymes CYP (Förlin et Andersson, 1985 ; Lindström-Seppä et Hänninen, 1988).
7. D'une façon générale, il est recommandé de réunir dans un même lot la RT-S9 de plusieurs poissons (trois à six). Cette approche permet de limiter l'influence des caractéristiques individuelles et d'obtenir une meilleure représentation d'une population.

8. Après avoir sacrifié le poisson par une méthode humaine (cf. § 19), canuler la veine porte hépatique et perfuser le foie avec une solution tampon saline équilibré sans  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (tampon de perfusion, cf. tableau 1) afin d'éliminer le sang du foie.

9. Le foie est prélevé, homogénéisé dans un tampon d'homogénéisation (tableau 1) et centrifugé à 13 000 – 15 000 x g pendant 20 min à 4 °C.

10. Le surnageant résultant de la centrifugation est aspiré et aliquoté dans des tubes de microcentrifugation ou des flacons cryogéniques, et stocké à  $-80 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### *Appareillage et matériel*

#### 11. Appareillage

- Cuves d'exposition des poissons à l'anesthésique
- Balance numérique (1 g – 2000 g), nacelles de pesée
- Pince à dissection, petits et grands ciseaux chirurgicaux tranchants, lames de rasoir à simple tranchant
- Centrifugeuse réfrigérée (pour tubes de 50 mL, par exemple)
- Tubes à centrifuger coniques (50 mL, par exemple)
- Set de perfusion 23-G  $\times$   $\frac{3}{4}$  à ailettes de sécurité (cathéter papillon)
- Seringues en matière plastique jetables 30 mL
- Pompe péristaltique
- Tubage pour pompe
- Boîtes de Pétri en verre de 6 cm, pré-réfrigérées
- Bêchers en verre
- Broyeur de tissu Wheaton type Potter-Elvehjem 30 mL avec pilon en Téflon
- Broyeur à mortier de laboratoire
- Pipettes
- Embouts de pipettes
- Aide au pipetage pour pipettes sérologiques
- Pipettes sérologiques
- Tubes de stockage cryogénique, volume de travail 1.8 mL
- Tubes de microcentrifugation

#### 12. Produits chimiques et réactifs

- Méthanesulfonate de tricaïne (MS-222)
- Bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ )
- Solution saline équilibrée de Hank (HBSS) sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$

- Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES)
- Chlorhydrate de tris hydroxyméthyl-aminométhane (Tris-Cl), 1 M ; pH 7.8
- Chlorure de potassium (KCl), 1 M
- Sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA-Na<sub>2</sub> ; 0.5 M)
- Dithiothréitol (DTT), 100 mM
- Cocktail inhibiteur de protéases (facultatif)
- Sucrose
- Hydroxyde de sodium (NaOH), 1 M
- Hydroxyde de potassium (KOH), 1 M
- Kit du commerce pour le dosage de la teneur de RT-S9 en protéines.

### *Préparation des réactifs et des solutions*

13. Le méthanesulfonate de tricaine (MS-222 ; 150 mg/L) doit être préparé avec de l'eau provenant de la même source que l'eau utilisée pour maintenir les poissons préparés ; pour 8 L, par exemple, 1.2 g de MS-222 est ajouté à l'eau et mélangé jusqu'à dissolution. Une quantité prédéterminée de NaHCO<sub>3</sub> est utilisée pour maintenir le pH de l'eau de source. Si l'eau est faiblement alcaline, la masse de NaHCO<sub>3</sub> requise correspond à environ 3 fois la masse de MS 222.

14. Deux tampons (tampon de perfusion et tampon d'homogénéisation) sont préparés selon le tableau 1. Les quantités indiquées sont suffisantes pour perfuser une quinzaine de poissons.

**Tableau 1 : Réactifs et concentrations pour les tampons de perfusion et d'homogénéisation**

	Réactif	Pour 1000 mL de préparation	Concentration
<b>Tampon de perfusion</b> pH 7.8 ; stocker à 4°C	1 x HBSS (sans sels de Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	985.4 mL	
	EDTA 0.5 M	4.6 mL	2.3 mM
	HEPES 1 M	10 mL	10 mM
<b>Tampon d'homogénéisation*</b> pH 7.8 ; stocker à 4°C	Tris-HCl pH= 7.8 1 M	800 mL	50 mM
	KCl 1 M	150 mL	150 mM
	EDTA 0.5 M	4 mL	2 mM
	DTT 100 mM	10 mL	1 mM
	sucrose	85.55 g	250 mM

\* Des inhibiteurs de protéases peuvent être ajoutés au tampon d'homogénéisation

15. Le tampon de perfusion est préparé comme suit : de la solution saline équilibrée de Hank (HBSS contenant du  $\text{NaHCO}_3$  4.2 mM (0.35 g/L) ; sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ) est additionnée d'EDTA (concentration cible 2.3 mM) et d'HEPES (concentration cible 10 mM). Exemple : à 985.4 mL d'HBSS (contenant du  $\text{NaHCO}_3$ ), ajouter 4.6 mL d'EDTA 0.5 M et 10 mL d'HEPES 1 M. Ajuster le pH à 7.8 avec NaOH 1 M et stocker le tampon de perfusion à 4 °C. Les tampons sont préparés frais chaque mois et éliminés s'ils sont visiblement contaminés (particules en suspension et aspect trouble).

16. Le tampon d'homogénéisation (1 L, par exemple) est préparé en mélangeant tout d'abord 50 mL de tris-HCl 1 M et 950 mL d'eau ultrapure. Dans un flacon jaugé de 1 L, ajouter à 800 mL de tris-HCl 50 mM : 150 mL de KCl 1 M, 4 mL d'EDTA 0.5 M, 10 mL de DTT 100 mM et 85.55 g de sucrose. Ajuster le pH à 7.8 avec KOH 1 M, puis compléter jusqu'au volume final avec du tris-HCl 50 mM. Stocker le tampon d'homogénéisation à 4 °C. Les tampons sont préparés frais chaque mois et éliminés s'ils sont visiblement contaminés (particules en suspension et aspect trouble). Les inhibiteurs de protéases sont ajoutés s'il y a lieu à la dernière étape.

### *Description détaillée*

#### *Préparation des poissons et chirurgie*

17. Les poissons doivent jeûner 24 h avant le sacrifice.

18. Les protéines de RT-S9 se dégradant rapidement à température ambiante, il importe de prendre toutes les dispositions nécessaires pour réaliser ces procédures en utilisant des tampons, des instruments et de la verrerie glacés.

19. Au moyen d'une épuisette, on capture les poissons et on les transfère dans un aquarium ou un seau contenant 8 L de solution anesthésique (MS-222) préparée au préalable. Les poissons doivent être immergés dans la solution de MS-222 pendant au moins 1 min. Ils sont convenablement anesthésiés lorsque les mouvements operculaires ont cessé, que la perte d'équilibre et de tonus musculaire est complète et qu'ils ne répondent pas aux stimuli (une pression ferme à la base de la queue peut être utilisée pour déterminer la réponse aux stimuli). Les poissons sont ensuite tués par une méthode humaine, d'un coup sec à la tête.

20. Le poids des poissons est consigné.

21. Les poissons sont posés face ventrale vers le haut. Il est recommandé de pratiquer les incisions suivantes, illustrées par la figure 1 : a) incision suivant la ligne médiane, de l'orifice anal à l'isthme, en prenant soin de ne pas pénétrer trop profondément dans la cavité corporelle ; puis b) une incision latérale au niveau de l'extrémité caudale de l'incision médiane, remontant jusqu'à mi-distance environ de la surface dorsale ; et c) une incision latérale similaire juste en arrière de l'opercule.

22. Le volet ainsi formé est rabattu et retiré, ce qui découvre la cavité corporelle ; le foie doit être rouge foncé (figure 2). La branche ventrale de la veine porte hépatique (reliant l'intestin au hile hépatique) doit être localisée et débarrassée avec précaution de tout tissu conjonctif faisant obstacle à la vue.

23. Il est possible, en option, de former une boucle lâche au moyen de matériel de suture en soie (4-0) sous la veine porte hépatique avant de la canuler (figure 2) au moyen d'une aiguille à perfusion à ailettes de sécurité, 23-G  $\times$  3/4-in., reliée à une seringue de 30 mL remplie de tampon de perfusion glacé (cf. tableau 1). Le fil de suture est serré

autour de l'aiguille et noué pour éviter toute fuite de tampon de perfusion à partir du site d'insertion. La veine hépatique (ou les veines) reliant le foie au cœur est sectionnée pour permettre le drainage du tissu.

#### *Perfusion du foie*

24. Le foie est perfusé (à raison de 10-15 mL/min) avec 20 à 30 mL de tampon de perfusion glacé jusqu'à ce que le tissu prenne une couleur pâle (indiquant l'évacuation du sang, figure 3). Le foie est massé délicatement pendant la perfusion, afin de favoriser l'écoulement du sang, en particulier dans les zones où le sang est concentré. L'élimination du sang est nécessaire pour que la fraction RT-S9 soit exempte d'enzymes métabolisantes présentes dans le sang (protéases plasmatiques, notamment).

25. Après élimination du sang, on retire le foie et on le place dans une boîte de Pétri glacée, en veillant à ne pas entailler la vésicule biliaire (un sac à fines parois contenant normalement de la bile vert foncé ou brune). La vésicule biliaire est retirée avec précaution au moyen de ciseaux permettant de sectionner le tissu conjonctif qui la relie au foie. Le foie est rincé avec 5 à 10 mL de tampon de perfusion glacé, tenu prêt à cet effet dans une seringue de 30 mL. Nota : il est important que la bile ne contamine par la RT-S9 hépatique, ce qui dénaturerait et inactiverait les enzymes métaboliques. Cette étape de rinçage offre l'occasion de remédier à un éventuel contact du foie avec de petites quantités de bile. Les foies qui ont été en contact avec de grandes quantités de bile doivent être éliminés si possible de la suite des opérations.

26. Avant le pesage des foies à 0.01 g près, le fluide en excès est éliminé par essuyage des foies avec du papier absorbant. Le poids des foies est consigné (tableau 2). Le foie est placé dans un bécher de 250 mL contenant 150 mL de tampon d'homogénéisation glacé, qui est maintenu sur de la glace jusqu'à ce que tous les poissons du lot aient été prélevés et les foies recueillis.

27. Les gonades (ovaires ou testicules) sont intégralement retirées et pesées à 0.01 g près. L'indice gonado-somatique (IGS) de l'animal donneur est déterminé par division du poids des gonades par le poids total de l'animal ( $IGS = (100 \times \text{masse des gonades}) / \text{masse totale de l'animal}$ ). Le poids des gonades et l'IGS sont consignés (tableau 2). Les gonades (testicules ou ovaires) se présentent sous la forme de deux brins de tissu longeant la cavité péritonéale du côté de la face ventrale des reins. La maturité sexuelle de la truite peut être déterminée d'après l'IGS. En règle générale, les mâles ayant un  $IGS < 0.05$  et les femelles ayant un  $IGS < 0.5$  peuvent être considérés comme sexuellement immatures. Une autre solution pour déterminer la maturité sexuelle est de recourir à l'histologie (Blazer, 2002). On trouvera des descriptions précises du développement des gonades chez la truite in Billard et Escaffre, 1975 ; Gomez et al., 1999 ; Le Gac et al., 2001.

28. Le nombre souhaité de poissons est prélevé conformément aux §§ 17-27. Il importe de procéder rapidement. Le temps total écoulé entre la capture d'un poisson et la dépose du foie dans le tampon d'homogénéisation doit être inférieur à 15 min.

#### *Obtention et préparation de la RT-S9*

29. Après prélèvement et pesée, les foies sont traités comme suit. Ils sont d'abord découpés en petits fragments ( $< 0.5 \text{ cm}^2$ ) au moyen d'une paire de ciseaux et/ou d'une lame de rasoir à simple tranchant.

30. Le tissu ainsi découpé, dans du tampon d'homogénéisation, est transféré dans un mortier Potter-Elvehjem (préalablement réfrigéré et placé sur de la glace) et le bécher est

rincé avec un volume additionnel (équivalent au poids du foie) de tampon d'homogénéisation. Ce volume, ainsi que tous les résidus de tissu éventuels, sont transférés dans le mortier. Le tissu est homogénéisé au moyen d'un pilon en Téflon (entrefer pilon-mortier normal 0.1 à 0.15 mm) fixé à un broyeur à mortier de laboratoire réglé à faible vitesse (500 tr/min, par exemple). Pour cela, on enfonce lentement le pilon (10 à 15 sec par poussée) vers le fond du mortier, à quatre ou cinq reprises. Une homogénéisation plus poussée n'est pas nécessaire et peut provoquer une dénaturation des protéines.

31. L'homogénat de foie est transvasé dans un tube à centrifuger à fond rond de 50 mL (pré-réfrigéré et placé sur de la glace). Tous les foies sont traités selon les procédures décrites aux §§ 24-28. Compte tenu des tailles de poisson (400 à 600 g) et du nombre de prélèvement (quatre à cinq) recommandés, le volume d'homogénat de foie cru obtenu devrait être de l'ordre de 50 à 70 mL.

32. Les homogénats de foie sont centrifugés pendant 20 min à  $13\,000 \times g$ , 4 °C. Les tubes sont retirés avec précaution de la centrifugeuse. Selon la teneur en lipides des foies prélevés, une couche de lipides jaune peut se former à la surface du surnageant. Cette couche est aspirée au moyen d'une pipette Pasteur et éliminée. Le reste du surnageant (donc la fraction RT-S9 de tous les animaux) est décanté ou aspiré avec une pipette sérologique dans un bécher réfrigéré de 150 mL, en prenant soin de ne transférer aucun élément du culot. Le culot au fond du tube de centrifugation doit être relativement ferme et de couleur brune. Une couche plus claire peut se former à la surface du culot.

33. La RT-S9 de tous les animaux prélevés est mélangée à l'aide d'une tige de verre ou équivalent, et des aliquotes de la solution (de 0.5 mL, par exemple) sont transférées dans des tubes de stockage cryogénique ou de microcentrifugation de 1.8 mL pré-étiquetés, et congelées instantanément dans l'azote liquide (ou équivalent). Nota : il est extrêmement important de maintenir constamment la RT S9 sur de la glace. Quatre à cinq poissons de la taille recommandée donneront de 35 à 45 mL de RT-S9. Si le volume des aliquotes de stockage est de 0.5 mL, il faudra pré-étiqueter 70 à 90 tubes de stockage cryogénique. Les tubes étiquetés doivent être réfrigérés avant de recevoir les échantillons, et stockés 24 h au maximum dans un congélateur à -20 °C jusqu'au dernier moment avant utilisation.

34. Les tubes de stockage contenant la RT-S9 sont réunis et transférés dans l'azote liquide ou un congélateur à  $-80 \pm 1$  °C pour stockage (possible pendant 2 ans au moins).

35. Le volume total de RT-S9 obtenu à l'issue d'une opération de prélèvement est consigné. Cette valeur est utilisée pour calculer la concentration de protéines de la RT-S9 par gramme de tissu hépatique.

#### *Détermination de la teneur en protéines de la RT-S9*

36. Trois échantillons de RT-S9 sont décongelés dans un bain d'eau et de glace (porte-tubes de microcentrifugation flottant dans un bécher contenant de l'eau et de la glace, par exemple) et placés sur de la glace une fois les cristaux de glace dissous. La teneur en protéines est déterminée dans un échantillon de RT-S9 homogène, mélangé avec soin, par une méthode standard ([Bradford, 1976 ; Lowry et al., 1951], par exemple) ou au moyen d'un kit de dosage des protéines du commerce, selon les instructions du fabricant (plaques 96 puits à fond plat, par exemple, et lecteur de microplaques, bioanalyseur, cuvettes et spectrophotomètre, ou autres instruments et méthodes permettant une détermination exacte de la concentration de protéines). La dilution de la

RT-S9 utilisée pour la détermination de la concentration de protéines doit être telle que la valeur se situe dans la section linéaire de la courbe standard, afin d'éviter une sous- ou surestimation de la teneur en protéines. La teneur en protéines d'un lot de RT-S9 donné est la moyenne des valeurs des réplicats.

### *Modèle de rapport*

**Tableau 2. Consignation des données relatives aux poissons, conditions de maintien et observations individuelles**

Espèce (*O. mykiss*, par exemple) : \_\_\_\_\_

Souche (s'il y a lieu) : \_\_\_\_\_

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

Photopériode (naturelle, par exemple) : \_\_\_\_\_

Température de l'eau (°C) : \_\_\_\_\_

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

Débit d'eau (L/min) : \_\_\_\_\_

pH : \_\_\_\_\_

Oxygène dissous (mg/L) : \_\_\_\_\_

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

Nombre de poissons/aquarium : \_\_\_\_\_

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

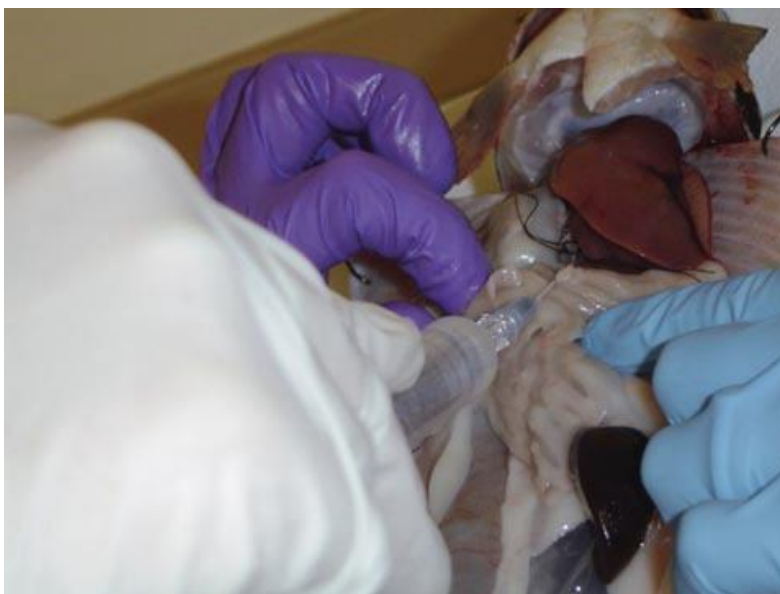
Type d'aliments (aliment pour truite Silver Cup de Nelson, par exemple) : \_\_\_\_\_

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

*Figures***Figure 1. Incisions pratiquées après l'euthanasie pour accéder aux organes internes.**

*Note* : Le poisson ci-dessus est à maturité sexuelle et n'est présenté qu'à des fins d'illustration. La RT-S9 doit provenir de poissons sexuellement immatures.

*Source*: Johanning et al. (2012).

**Figure 2. Canulation de la veine porte hépatique afin d'éliminer le sang du foie**

*Source*: Johanning et al. (2012).



Figure 3. Aspect décoloré d'un foie qui a été vidé de son sang.



*Note:* Le poisson ci-dessus est à maturité sexuelle et n'est présenté qu'à des fins d'illustration. La RT-S9 doit provenir de poissons sexuellement immatures.

*Source:* Johannang et al. (2012).

## References

- Billard, R. and Escaffre, A. (1975), Identification of spermatogenesis stages in the rainbow trout based on gonad morphology and spermiation (in French), *Bulletin français de la pêche et de la pisciculture* 256:111-118.
- Blazer, V. (2002), Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes, *Fish Physiology and Biochemistry* 26:85-1201.
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Fay, K.A. et al. (2014), Optimizing the use of rainbow trout hepatocytes for bioaccumulation assessments with fish, *Xenobiotica* 44:345-351.
- Förlin, L., and Andersson, T. (1985), Storage conditions of rainbow trout liver cytochrome P-450 and conjugating enzymes, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 80:569-572.
- Gomez, J.M. et al. (1999), Growth hormone receptors in ovary and liver during gametogenesis in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Journal of Reproduction and Fertility* 115:275-285.
- Johannang, K. et al. (2012), Assessment of metabolic stability using the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fraction, *Current Protocols in Toxicology* 53:14.10.1-28.

- Johanning, K. et al., (2010), In vitro rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 metabolism assay: optimizing the assay conditions to determine chemical bioaccumulation potential, SETAC Europe 20th Annual Meeting, Seville, Spain.
- Le Gac, F. et al. (2001), In vivo and in vitro effects of prochloraz and nonylphenol ethoxylates on trout spermatogenesis, *Aquatic Toxicology* 53:187-200.
- Lindström-Seppä, P., and Hänninen, O. (1988), Sampling and storage conditions of rainbow trout liver affects monooxygenase and conjugation enzymes, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 89:221-224.
- Lowry, O. H. et al. (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- OECD (2018), Multi-laboratory ring trial to support development of OECD test guidelines on determination of in vitro intrinsic clearance using cryopreserved rainbow trout hepatocytes and liver S9 sub-cellular fractions, Series on Testing and Assessment No. 281, OECD Publishing, Paris.

---

**ANNEXE 3****Caractérisation de la fraction subcellulaire S9 du foie de truite arc-en-ciel (RT-S9)**

1. La capacité de chaque lot de RT-S9 isolé à catalyser les réactions de biotransformation de phases I et II doit être évaluée. Ces tests de caractérisation peuvent être réalisés sur des fractions RT-S9 fraîchement préparées ou décongelées.
2. Le tableau 1 fournit une liste de tests standardisés proposés pour la mesure de l'activité de biotransformation de phases I et II ; ces tests sont décrits brièvement in Johanning et al., 2012. Le tableau 1 donne un aperçu des méthodes les plus courantes, des substrats et des documents de référence. Les résultats de ces tests doivent être inclus dans le rapport d'essai.
3. L'activité de la RT-S9 peut également être évaluée sur des produits chimiques d'essai connus, bien caractérisés.
4. En règle générale, la RT-S9 est diluée à la concentration de protéines spécifiée pour le test pratiqué. Les résultats sont ensuite normalisés en teneur en protéines, déterminée selon la méthode décrite à l'annexe 2.
5. Lorsque la voie probable par laquelle s'effectue la biotransformation d'un produit chimique testé est connue, il peut être judicieux d'évaluer cette voie à l'avance, si l'on dispose d'un test standardisé pour la mesure de cette activité. Des tests évaluant des effets au bout d'un temps fixé (activité enzymatique à 30 min, par exemple) ou des méthodes cinétiques de détermination de l'activité peuvent être utilisés. En cas de comparaison avec d'autres laboratoires, on tiendra compte des conditions précises de conduite des essais (concentration de substrat, concentration de protéines, durée(s) d'incubation, effet mesuré ou points dans le temps, notamment).

**Tableau 1 : Tests d'activité enzymatique courants, substrats et documents de référence utilisables pour caractériser l'activité de la RT-S9.**

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

---

## References

- Castren, M., and Oikari A. (1983), Optimal assay conditions for liver UDP-glucuronosyltransferase from the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 76:365–369.
- Cravedi, J.P., Perdu-Durand, E., and Paris, A. (1998), Cytochrome P450-dependent metabolic pathways and glucuronidation in trout liver slices, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 121:267-275.
- Edwards, A.M. et al. (1984), 7-ethoxycoumarine deethylase activity as a convenient measure of liver drug metabolizing enzymes: Regulation in cultured hepatocytes, *Biochemical Pharmacology* 33:1537–1546.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. (1974), Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *Journal of Biological Chemistry* 249:7130-7139.
- Johanning, K. et al. (2012), Assessment of metabolic stability using the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fraction, *Current Protocols in Toxicology* 53:14.10.1-28.
- Ladd, M.A., Fitzsimmons, P.N., and Nichols, J.W., (2016), Optimization of a UDP-glucuronosyltransferase assay for trout liver S9 fractions: activity enhancement by alamethicin, a pore-forming peptide, *Xenobiotica* 46:1066-1075.
- Leguen, I. et al. (2000), Xenobiotic and steroid biotransformation activities in rainbow trout gill epithelial cells in culture. *Aquatic Toxicology* 48:165–176.
- Nabb, D.L. et al. (2006), Comparison of basal level metabolic enzyme activities of freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat. *Aquatic Toxicology* 80:52–59.
- Oesch, F. et al. (1992), Improved sample preparation for the testosterone hydroxylation assay using disposable extraction columns, *Journal of Chromatography* 582:232–235.
- Peter, R. et al. (1990), Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chemical Research in Toxicology* 3:566–573.
- Wheelock, C. E. et al. (2005), Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology* 74: 172-192.

## ANNEXE 4

**Préparation de la fraction subcellulaire S9 du foie de truite arc-en-ciel (RT-S9) enzymatiquement inactive**

1. Il est suggéré aux laboratoires de préparer à l'avance une grande quantité de RT-S9 enzymatiquement inactive et de la congeler sous forme d'aliquotes (de 0.5 mL, par exemple).
2. L'inactivation enzymatique de la RT-S9 fournit le matériel témoin négatif du test de déplétion du substrat. L'inactivation est réalisée en routine par chauffage à 100 °C dans un flacon bouché placé dans un bain d'eau bouillante. En cas d'agglutination excessive du matériel enzymatiquement inactif ainsi obtenu, on peut traiter celui-ci dans un homogénéisateur actionné manuellement, afin d'obtenir un échantillon facile à pipeter (Johanning et al., 2012).
3. En cas de décroissance importante (> 20 %) du produit chimique testé dans la RT-S9 témoin enzymatiquement inactive, il est possible d'utiliser un autre témoin négatif (cf. Document d'orientation RT-HEP et RT-S9, annexe 4 [OCDE, 2018]).
4. Équipement :
  - Plaque chauffante
  - Bêcher rempli d'eau (bain-marie)
  - Récipient utilisé pour faire bouillir la RT-S9 dans le bain-marie, avec bouchon
  - Homogénéisateur de tissus (de 15 mL, par exemple) actionné manuellement (en option)
  - Tubes de microcentrifugation de 1.5 mL
5. Matériel :
  - RT-S9 de teneur en protéines connue
6. Le volume de la suspension est consigné et la suspension est transférée dans un récipient résistant à la chaleur (en verre, de préférence).
7. Un bêcher d'eau est chauffé sur une plaque chauffante jusqu'à ébullition de l'eau. Un récipient fermé par un bouchon, contenant la suspension de RT-S9, est placé dans le bain d'eau bouillante, et la suspension est portée à ébullition lente pendant 15 min.
8. Lorsqu'elle a refroidi, la RT-S9 est transférée dans un cylindre gradué et le volume est ajusté par addition de tampon phosphate de potassium 100 mM, afin de maintenir la concentration souhaitée. EN OPTION : si une agglutination excessive est observée, transférer la solution dans un homogénéisateur manuel, actionné jusqu'à ce que la solution soit homogène (Johanning et al., 2012).
9. La RT-S9 est diluée au moyen de tampon phosphate de potassium 100 mM jusqu'à la concentration souhaitée (10 mg/mL, par exemple) avant d'être utilisée pour un essai.
10. Des aliquotes (de 0.5 mL, par exemple) de la RT-S9 enzymatiquement inactive sont transférées dans des tubes de microcentrifugation de 1.5 mL et stockées à  $-20 \pm 1$  °C jusqu'à utilisation.

---

## References

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

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

## ANNEXE 5

## Essais préliminaires de détermination des conditions de réaction

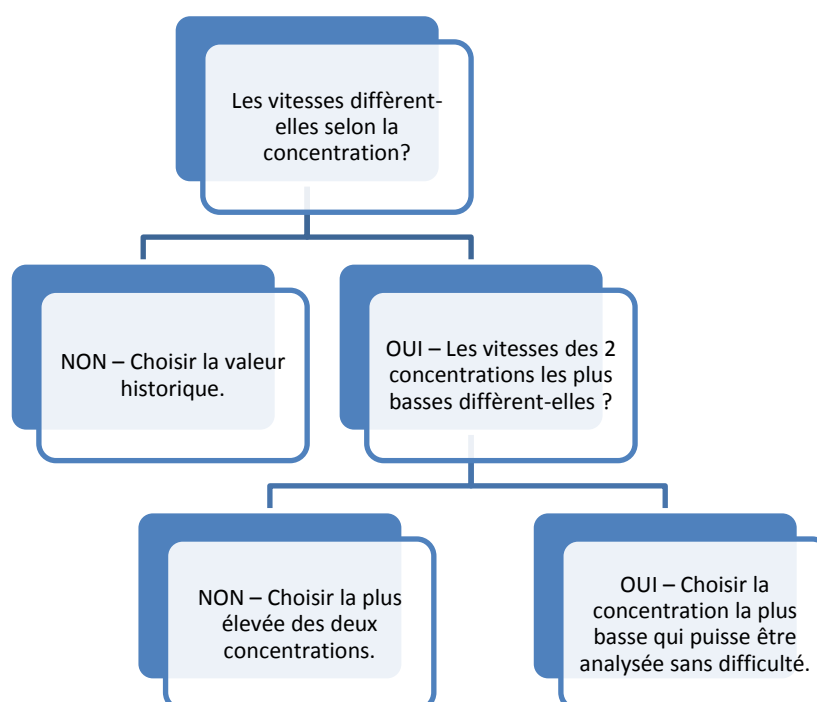
1. Les essais préliminaires ont pour principal objectif de déterminer les conditions de réaction donnant une cinétique de déplétion de premier ordre. Ces essais servent à établir un programme d'échantillonnage qui permette d'évaluer la déplétion du produit chimique testé (en mettant en évidence les différences significatives par rapport aux témoins négatifs) tout en préservant la capacité de quantifier la concentration du produit chimique testé dans le système jusqu'aux mesures finales. Les essais préliminaires sont réalisés sur des fractions RT-S9 dont l'activité enzymatique métabolique de phases I et II a été caractérisée (cf. annexe 3).
2. Il faut disposer d'une méthode analytique dont l'exactitude, la précision et la sensibilité pour quantifier le produit chimique testé dans le milieu d'essai sont connues, ainsi que d'instructions précises pour la préparation et le stockage des échantillons. La limite analytique de quantification (Ldq) du produit chimique testé dans le milieu d'essai doit être connue.
3. Pour obtenir une vitesse de déplétion du produit chimique qui puisse être utilisée dans le modèle d'extrapolation *in vitro-in vivo*, il est généralement souhaitable de parvenir à une déplétion du produit chimique testé de 20 % à 90 % au cours de l'essai. Les variables qui peuvent être testées pour parvenir à ce résultat sont notamment la concentration de protéines, la concentration initiale du produit chimique testé et la durée totale d'incubation (Johanning et al., 2012).
4. Outre ces conditions de détermination des plages de valeurs, d'autres aspects à prendre en compte pour une mesure exacte de la déplétion du substrat sont notamment : la sensibilité de la méthode analytique et le recours à un étalon interne, le choix des solvants utilisés pour dissoudre le produit chimique testé, l'introduction dans le système et l'arrêt de la réaction, ainsi que l'utilisation de témoins positifs (produit chimique de référence) et négatifs (cf. annexe 4 et [OCDE, 2018]).
5. Il est généralement recommandé de conduire les essais de déplétion du substrat, essais préliminaires compris, à des concentrations de protéines de 0.25-2 mg/mL, 1 mg/mL étant la valeur la plus couramment utilisée.
6. La concentration initiale de produit chimique testé est déterminée par la nécessité de parvenir à une cinétique de premier ordre, ainsi que par la sensibilité de la méthode analytique, sachant qu'il peut être nécessaire de mesurer des concentrations nettement plus basses que les valeurs initiales (à des points dans le temps ultérieurs). La sensibilité de la méthode analytique doit garantir l'exactitude des mesures pour tous les points dans le temps, ou pour 10 % de la concentration initiale du produit chimique testé. En théorie, plus la concentration initiale est inférieure à la constante de Michaelis-Menten,  $K_M$ , plus la probabilité d'une cinétique de premier ordre est forte.  $K_M$  est la concentration de substrat à laquelle la vitesse de réaction est de  $\frac{1}{2} V_{max}$  (vitesse maximale atteinte par le système à la concentration de saturation maximale de substrat). En pratique, il n'est pas toujours possible de parvenir à ces concentrations, du fait des limites de détection de la méthode d'analyse du produit chimique testé. L'expérience montre qu'une concentration initiale se situant dans la gamme des valeurs micromolaires les plus basses/nanomolaires les plus élevées ( $\leq 1.0 \mu M$ , par exemple) donne souvent des résultats satisfaisants ; cependant, les utilisateurs s'efforceront de conduire les essais de déplétion à la



concentration la plus basse raisonnablement possible pour le produit chimique testé. D'autres considérations relatives aux concentrations de produit chimique figurent dans le Document d'orientation RT-HEP et RT-S9 (OCDE, 2018).

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

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



9. Les essais préliminaires sont généralement conduits sur un nombre limité de points dans le temps (6, 30 et 60 min, par exemple). La concentration initiale de produit chimique qui donne la vitesse de déplétion la plus élevée est habituellement retenue pour l'essai définitif. Si plusieurs concentrations du produit chimique testé donnent des vitesses de déplétion similaires, c'est la concentration la plus élevée qui est retenue, car elle posera moins de problèmes de limite de détection.

10. Selon les besoins, le schéma d'échantillonnage peut couvrir une durée de < 10 min à 2 h, habituellement ; pour les produits chimiques dont la biotransformation est très lente, cette durée peut atteindre 4 h en intégrant les six points dans le temps recommandés au minimum pour les prélèvements.

11. Il ne faut pas s'attendre à ce que les constantes de vitesse de déplétion de premier ordre calculées à partir de ces essais varient en proportion directe de la concentration de protéines ou de la concentration du produit chimique testé. Il n'est pas recommandé d'augmenter la concentration de protéines au-delà de 2 mg/mL, afin d'éviter la saturation des enzymes.

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

13. Dans certains cas, la transformation logarithmique des données peut donner un profil suggérant une cinétique bi-exponentielle, avec une phase initiale de déplétion « rapide » suivie d'une phase terminale de déplétion « lente ». Ce profil peut être dû à une inhibition liée au produit (l'accumulation de métabolites inhibant l'activité enzymatique aux derniers points dans le temps), à une limite liée aux cofacteurs ou à la saturation des enzymes. Une réduction de la concentration initiale de produit chimique ainsi que de la concentration de protéines peut être tentée pour résoudre le problème (Johanning et al., 2012).

## References

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

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

ANNEXE 6

Configurations d'essai

**Configuration 1 : méthode utilisant un seul flacon (figure 1)**

1. La méthode à un seul flacon est recommandée pour l'essai des produits chimiques ne présentant pas de difficulté particulière (produits non volatils, n'adhérant pas aux parois des récipients et se distribuant rapidement dans le système d'incubation, par exemple). C'est la configuration qui procure généralement les résultats les moins variables, et la plus simple à réaliser.
2. Conformément aux indications des §§ 34 et suivants du texte principal, les incubations sont réalisées dans un seul flacon contenant par exemple 1 mL de suspension de RT-S9. Les échantillons (100 µL) sont prélevés dans ce flacon aux points dans le temps qui ont été définis, et transférés dans un tube de microcentrifugation contenant une solution d'arrêt.
3. Un minimum de 6 points dans le temps est nécessaire pour déterminer la CL, IN VITRO, INT ; la configuration d'essai doit donc inclure  $\geq 6$  points dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple).

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

1 <sup>re</sup> épreuve	RT-S9 active Produit chimique testé	A	Sous-échantillons prélevés à chaque point dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple)
	RT-S9 enzymatiquement inactive Produit chimique testé	A	
	RT-S9 active Produit chimique de référence	A	
2 <sup>e</sup> épreuve	RT-S9 active Produit chimique testé	B	Sous-échantillons prélevés à chaque point dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple)
	RT-S9 enzymatiquement inactive Produit chimique testé	B	
	RT-S9 active Produit chimique de référence	B	
3 <sup>e</sup> épreuve (s'il y a lieu)	RT-S9 active Produit chimique testé	C	Sous-échantillons prélevés à chaque point dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple)
	RT-S9 enzymatiquement inactive Produit chimique testé	C	
	RT-S9 active Produit chimique de référence	C	

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

4. Cette configuration, qui comporte des incubations dans des flacons individuels, est recommandée pour les produits chimiques d'essai volatils ou très hydrophobes.
5. Les incubations avec des substances d'essai volatiles peuvent être réalisées dans des flacons pour GC contenant par exemple 200 µL de mélange d'incubation de la RT-S9, fermés par un bouchon doublé d'un septum, après la période de pré-incubation. Une seringue peut alors être utilisée pour introduire d'une part le produit chimique testé

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

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

7. Comme dans la méthode à un seul flacon, chaque essai comporte au minimum deux épreuves indépendantes de détermination de la CL, IN VITRO, INT. Les épreuves indépendantes se déroulent des jours distincts, ou le même jour à condition que pour chaque épreuve : a) les solutions du produit chimique testé (solutions-mères et solutions de travail fraîches) soient préparées indépendamment et b) la RT-S9 utilisée soit décongelée indépendamment. À chaque épreuve, le nombre préétabli de flacons est préparé pour la RT-S9 active (14 par exemple au total, 7 pour le produit chimique testé et 7 pour le produit chimique de référence) et pour la RT-S9 inactive (7, par exemple). Le produit chimique testé et le produit chimique de référence sont introduits dans les flacons selon le schéma de la figure 2. La solution d'arrêt est ajoutée directement à chaque flacon aux différents points dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple). Pour plus de précisions, on se reportera à Johanning et al., 2012.

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

1 <sup>re</sup> épreuve	RT-S9 active Produit chimique testé 2 10 20 30 60 90 120	Solution d'arrêt ajoutée directement à chaque flacon aux différents points dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple)
	RT-S9 enzymatiquement inactive Produit chimique testé 2 10 20 30 60 90 120	
	RT-S9 active 2 10 20 30 60 90 120 Produit chimique de référence	
2 <sup>e</sup> épreuve	RT-S9 active Produit chimique testé 2 10 20 30 60 90 120	Solution d'arrêt ajoutée directement à chaque flacon aux différents points dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple)
	RT-S9 enzymatiquement inactive Produit chimique testé 2 10 20 30 60 90 120	
	RT-S9 active 2 10 20 30 60 90 120 Produit chimique de référence	
3 <sup>e</sup> épreuve (s'il y a lieu)	RT-S9 active Produit chimique testé 2 10 20 30 60 90 120	Solution d'arrêt ajoutée directement à chaque flacon aux différents points dans le temps (2, 10, 20, 30, 60, 90, 120 min, par exemple)
	RT-S9 enzymatiquement inactive Produit chimique testé 2 10 20 30 60 90 120	
	RT-S9 active 2 10 20 30 60 90 120 Produit chimique de référence	

## References

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

## ANNEXE 7

### Préparation des Solutions Tampons et des Solutions de Cofacteurs et d'alaméthicine, et Dilution de la Fraction RT-S9 à la Concentration de Protéines de Travail

1. Les solutions-mères de tampon phosphate de potassium mono- et dibasique sont préparées selon les indications du tableau 1.

**Tableau 1 : Solutions-mères de tampon phosphate de potassium mono- et dibasique**

Réactif	mM	mg	Volume d'eau ultrapure (mL)	Température et durée de stockage
Tampon phosphate de potassium dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	100	1.742	100	4°C ; 1 mois max
Tampon phosphate de potassium monobasique (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	100	0.681	50	4°C ; 1 mois max

2. Le tampon phosphate de potassium (tampon KPO<sub>4</sub> ; pH 7.8, 100 mM) est préparé selon les indications du tableau 2.

**Tableau 2 : Préparation du tampon phosphate de potassium 100 mM (tampon KPO<sub>4</sub>), pH 7.8 à 11 ± 1 °C**

Réactif	Concentration	Tampon dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) (mL)	Tampon monobasique (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) (mL)	Volume total (mL)	pH à 11 °C	Température de stockage
Tampon phosphate de potassium (KPO <sub>4</sub> ), pH 7.8 +/- 0.1	100 mM	88	12	100	7.8	4°C ; 1 mois max

3. Du tampon phosphate de potassium dibasique ou monobasique peut être ajouté pour ajuster le pH à 7.8 à 11 ± 1 °C.

4. Préparation de la solution-mère et de la solution de travail d'alaméthicine :

- La solution-mère d'alaméthicine (10 mg/mL) est préparée dans le méthanol, par addition de 0.1 mL de méthanol par mg d'alaméthicine dans le flacon. Le flacon est vortexé avec soin et la solution-mère d'alaméthicine est stockée sous forme d'aliquotes de 25 µL dans des tubes de microcentrifugation (Eppendorf 1.5 mL, par exemple) à -20±1 °C jusqu'à utilisation.
- La solution de travail d'alaméthicine (250 µg/mL) dans du tampon KPO<sub>4</sub> est préparée par dilution d'une aliquote de 25 µL de la solution-mère à 10 mg/mL avec 975 µL de tampon KPO<sub>4</sub> (tableau 2).

5. Préparation des solutions de cofacteurs : les trois cofacteurs listés au tableau 3 peuvent être pré-pesés avant l'essai et stockés dans des flacons (Eppendorf 1.5 mL, par exemple) à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Le jour de l'essai, 1 mL de tampon KPO<sub>4</sub> glacé est ajouté à chaque flacon, les solutions sont vortexées jusqu'à dissolution complète puis stockées sur de la glace jusqu'à utilisation.

**Tableau 3 : Préparation de la solution de cofacteurs**

Cofacteurs	mM	mg	mL de tampon KPO <sub>4</sub> (glacé)
β-nicotinamide adénine dinucléotide 2'-phosphate, sel tétrasodique (NADPH)	20	16.67	1
Acide uridine 5'-diphosphoglucuronique, sel trisodique (UDPGA)	20	12.93	1
L-glutathion (GSH)	50	15.37	1

6. La pureté du quatrième cofacteur, l'adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS), étant généralement < 95 %, un ajustement est nécessaire pour la préparation de la solution. Il est en outre recommandé de préparer une solution concentrée (10 mM) avant le jour de l'essai et de la congeler sous forme d'aliquotes de 50 µL. Le jour de l'essai, une aliquote peut être décongelée et diluée à la concentration de travail (1 mM).

- Calculer la quantité de produit chimique nécessaire pour préparer une solution de PAPS 10 mM. Un ajustement minutieux de la pureté tiendrait compte des données spécifiques du lot utilisé sur la pureté de l'acide anhydre, le % d'eau, le % de lithium et le % de solvant. Cependant, pour les besoins de l'essai, un simple ajustement fondé sur la pureté de l'acide anhydre et la teneur en eau sera suffisant.
    - $\text{Masse de produit chimique} \times \text{teneur en acide anhydre} \times (1 - \text{teneur en eau}) / 507.26 \text{ g/mol} = \text{mol d'acide anhydre}$
    - $\text{Volume de tampon KPO}_4 \text{ (mL)} \text{ à ajouter} = (\text{mmol d'acide anhydre}/10 \text{ mM}) \times 1000 \text{ mL/L}$
  - Ajuster un petit volume (25 mL, par exemple) de tampon KPO<sub>4</sub> glacé au pH 8.0 par addition de solution de phosphate de potassium dibasique (cf. tableau 1).
  - Dissoudre le PAPS dans le volume de tampon KPO<sub>4</sub> glacé de pH 8.0 établi par calcul (le PAPS est plus stable lorsqu'il est congelé, au pH 8).
  - Préparer des aliquotes de 50 µL dans des tubes de microcentrifugation pré-refroidis et congeler immédiatement à  $-80 \pm 1^\circ\text{C}$ .
7. Un master mix de cofacteurs est préparé juste avant l'étape de pré-incubation avec chacun des cofacteurs pré-pesés (NADPH, UDPGA, GSH) et le PAPS.
8. Juste avant l'addition du master mix, une aliquote de la solution de PAPS 10 mM est décongelée et diluée avec 450 µL de KPO<sub>4</sub>.
9. Tous les cofacteurs sont réunis dans un master mix comme suit :

- 500  $\mu\text{L}$  de NADPH 20 mM
- 500  $\mu\text{L}$  d'UDPGA 20 mM
- 500  $\mu\text{L}$  de GSH 50 mM
- 500  $\mu\text{L}$  de PAPS 1 mM

Le master mix doit être vortexé avant d'être introduit dans les flacons de réaction.

10. Dilution de la RT-S9 active et enzymatiquement inactive à la concentration de protéines de travail : la RT-S9 active et la RT-S9 enzymatiquement inactive sont diluées à l'aide de tampon KPO4 afin d'obtenir des solutions de travail concentrées 10 fois, de telle sorte que la concentration de protéines appropriée soit apportée au système réactionnel dans un volume de 100  $\mu\text{L}$  (de RT-S9 active ou enzymatiquement inactive).

- La quantité de tampon KPO4 nécessaire pour obtenir la concentration de travail de RT-S9 appropriée (solution concentrée 10 fois) est déterminée.
- Exemple : concentration de RT-S9 active = 23.6 mg/L (protéines/mL) ; concentration cible pour le produit chimique testé : 1 mg/ml ; volume du tube de RT-S9 congelée 150  $\mu\text{L}$ , par exemple.
  - Teneur totale en protéines :  $23.6 \text{ mg/mL} \times 150 \mu\text{L} = 3540 \mu\text{g}$  de protéines.
  - Volume total nécessaire :  $3540 \mu\text{g de protéines} / 10 \text{ mg/mL} = 354 \mu\text{L}$ .
  - Tampon à ajouter :  $354 \mu\text{L} - 150 \mu\text{L} = 204 \mu\text{L}$  de KPO4.

**Figure 1. Description des constituants du mélange réactionnel dans un flacon à scintillation de 7 mL avant introduction du produit chimique testé.**

