

**LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS
CHIMIQUES****ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE *IN VITRO* CHEZ LES MAMMIFÈRES****INTRODUCTION**

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La Ligne directrice 473 originale a été adoptée en 1983. En 1997, une version révisée en a été publiée sur la base des avancées scientifiques réalisées jusqu'alors. La présente version modifiée de cette ligne directrice reflète les connaissances scientifiques acquises après plus de trente années d'expérience de cet essai et de l'interprétation des données. Elle s'inscrit dans une série de lignes directrices sur la toxicologie génétique. Par ailleurs, le document d'introduction aux lignes directrices sur les essais de toxicologie génétique (1), qui contient des éléments d'orientation concis et pratiques à l'intention des utilisateurs de ces lignes directrices, peut également être consulté à titre de référence.

2. L'essai d'aberration chromosomique *in vitro* est destiné à détecter les substances qui provoquent des aberrations chromosomiques structurales dans des cellules de mammifère cultivées (2) (3) (4). Les aberrations structurales peuvent être de deux types : chromosomiques ou chromatidiques. Il est possible que des cas de polyploïdie (y compris d'endoreduplication) surviennent dans les essais d'aberration chromosomique *in vitro*. Si les aneugènes peuvent induire une polyploïdie, la polyploïdie seule n'est pas le signe d'un potentiel aneugène et peut simplement indiquer une perturbation du cycle cellulaire ou une cytotoxicité (5). Cet essai n'est pas conçu pour mesurer l'aneuploïdie. Pour détecter l'aneuploïdie, il est recommandé de réaliser un test du micronoyau *in vitro* (6).

3. L'essai d'aberration chromosomique *in vitro* peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies ou des cultures de cellules primaires d'origine humaine ou de rongeurs. Les cellules employées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture, de la stabilité de leur caryotype (notamment leur nombre de chromosomes) et de la fréquence spontanée des aberrations chromosomiques (7). Les données disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas d'émettre des recommandations fermes mais tendent à montrer qu'il importe de tenir compte, lors de l'évaluation des dangers chimiques, du statut du *p53*, de la stabilité génétique (caryotype), de la capacité de réparation de l'ADN et de l'origine (rongeurs ou humains) des cellules retenues pour l'essai. Les utilisateurs de la présente Ligne directrice sont donc invités à prendre en considération l'influence de ces caractéristiques

cellulaires, et d'autres caractéristiques, sur les performances d'une lignée cellulaire quant à la détection de l'induction d'aberrations chromosomiques, sachant que les connaissances évoluent dans ce domaine.

4. Les définitions utilisées sont données à l'annexe 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

5. À moins que les cellules utilisées ne soient dotées d'un métabolisme compatible avec les substances testées, les essais conduits *in vitro* requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique. Or, les systèmes d'activation métabolique exogène sont incapables de reproduire parfaitement les conditions *in vivo*. On prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de conduire à de faux résultats positifs, c'est-à-dire à une lésion chromosomique qui ne soit pas causée par une interaction directe entre le produit chimique d'essai et les chromosomes ; ces conditions peuvent être une modification du pH ou de l'osmolalité (8) (9) (10), une interaction avec les composants du milieu (11) (12) ou une cytotoxicité excessive (13) (14) (15) (16).

6. Cet essai permet de détecter les aberrations chromosomiques pouvant résulter d'événements clastogènes. L'analyse de l'induction d'une aberration chromosomique doit être effectuée sur des cellules en métaphase. Il est donc indispensable que les cellules des cultures traitées et des cultures témoins atteignent le stade de la mitose. Pour les nanomatériaux manufacturés, il peut s'avérer nécessaire d'apporter certaines adaptations spécifiques à cette Ligne directrice, mais ces adaptations ne sont pas décrites dans ce document.

7. Avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on considérera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats dans cet objectif. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE L'ESSAI

8. Des cultures cellulaires d'origine humaine ou provenant d'autres mammifères sont exposées au produit chimique d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique, à moins que les cellules utilisées ne soient dotées de capacités métaboliques idoines (voir paragraphe 13). Après avoir été exposées au produit chimique d'essai, les cultures de cellules sont, à intervalles préétablis, traitées par un agent bloquant la métaphase (par exemple la colchicine ou le Colcemid®), récoltées et teintées. Les cellules en métaphase sont soumises à un examen microscopique permettant de déceler les aberrations chromatidiques et chromosomiques.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Cellules

9. Diverses lignées cellulaires (par exemple, ovaire de hamster chinois (CHO), poumon de hamster chinois V79, poumon de hamster chinois (CHL)/IU, TK6) ou cultures de cellules primaires peuvent être utilisées, y compris des lymphocytes du sang périphérique humain ou d'autres mammifères (7). Le choix

des lignées cellulaires utilisées doit être justifié scientifiquement. En cas d'utilisation de cellules primaires, pour des raisons relatives au bien-être des animaux, il conviendra d'envisager, lorsque cela est possible, le recours à des cellules primaires d'origine humaine, prélevées dans le respect des principes éthiques et de la réglementation en la matière. Les lymphocytes du sang périphérique humain utilisés sont issus de sujets jeunes (âgés de 18 à 35 ans environ), non fumeurs, ne souffrant d'aucune maladie connue et n'ayant pas été exposés récemment à des niveaux d'agents génotoxiques (produits chimiques, rayonnements ionisants, par exemple) susceptibles d'augmenter l'incidence de fond des aberrations chromosomiques, ceci afin de garantir que cette incidence soit faible et homogène. L'incidence de fond des aberrations chromosomiques augmente avec l'âge, et cette tendance est plus marquée chez la femme que chez l'homme (17) (18). Si des cellules issues de plusieurs donneurs sont mises en commun, le nombre des donneurs est précisé. Il est nécessaire de démontrer que les cellules se sont divisées entre le moment où elles ont été traitées avec le produit chimique d'essai et leur prélèvement. Les cultures cellulaires sont maintenues dans une phase de croissance exponentielle (lignées cellulaires) ou encouragées à se diviser (cultures primaires de lymphocytes) en vue de l'exposition des cellules à différents stades du cycle cellulaire, étant donné que la sensibilité des stades cellulaires aux substances chimiques d'essai peut ne pas être connue. En général, les cellules primaires dont la division doit être stimulée par des agents mitogènes ne sont plus synchronisées lors de leur exposition au produit chimique d'essai (les lymphocytes humains après une stimulation mitogène de 48 heures, par exemple). L'utilisation de cellules synchronisées pendant le traitement n'est pas recommandée mais peut être acceptable si elle est justifiée.

Milieu et conditions de culture

10. Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂ si nécessaire, température d'incubation de 37°C) appropriées pour les cultures. La stabilité du caryotype et l'absence de contamination par des mycoplasmes sont vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires (7) (19), et les cellules sont écartées si une contamination ou une modification du caryotype est constatée. La durée normale du cycle cellulaire des lignées ou des cultures primaires utilisées dans le laboratoire d'essai doit être établie et doit correspondre aux caractéristiques cellulaires publiées (20).

Préparation des cultures

11. Lignées cellulaires : les cellules sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans un milieu de culture à une densité telle que les cellules en suspension ou en monocouche poursuivront leur croissance de manière exponentielle jusqu'au moment de la récolte (il convient par exemple d'éviter que les cellules qui se multiplient en monocouche arrivent à confluence).

12. Lymphocytes : un sang total traité avec un anticoagulant (héparine, par exemple) ou des lymphocytes isolés sont mis en culture (pendant 48 heures pour les lymphocytes humains, par exemple) en présence d'un mitogène [phytohémagglutinine (PHA) pour les lymphocytes humains, par exemple] afin d'induire une division cellulaire avant l'exposition au produit chimique d'essai.

Activation métabolique

13. Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé, recommandé par défaut, sauf justification contraire, est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foies de rongeurs (généralement des rats) traités avec des inducteurs enzymatiques comme l'Aroclor 1254 (21) (22) (23) ou un mélange de phénobarbital et β-naphthoflavone (24) (25) (26) (27) (28) (29). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm

sur les polluants organiques persistants (30) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Aroclor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (24) (25) (26) (28). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 2 % (v/v) mais peut être portée à 10 % v/v dans le milieu d'essai final. Pendant le traitement, on évitera d'utiliser des produits entraînant une réduction de l'indice mitotique, en particulier des complexants du calcium (31). Le choix du type et de la concentration du système d'activation métabolique exogène ou de l'inducteur métabolique utilisé pourra dépendre de la classe des substances chimiques à tester.

Préparation du produit chimique d'essai

14. Les produits chimiques solides à tester sont dissous dans un solvant approprié puis, le cas échéant, dilués avant application (voir paragraphe 23). Les produits chimiques liquides peuvent être ajoutés directement ou après dilution au système d'essai. Les produits gazeux ou volatils nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients de culture hermétiquement clos (32) (33) (34). Il convient de préparer les produits chimiques d'essai juste avant le traitement, à moins que les données concernant la stabilité ne démontrent qu'ils peuvent être stockés.

Conditions de l'essai

Solvants

15. Le solvant doit être choisi de manière à optimiser la solubilité des substances chimiques d'essai, sans engendrer d'effets néfastes sur la conduite de l'essai, c'est-à-dire sans modifier la croissance cellulaire, nuire à l'intégrité du produit chimique d'essai, réagir avec les récipients de culture ou détériorer le système d'activation métabolique. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant (ou milieu de culture) aqueux chaque fois que c'est possible. L'eau et le diméthylsulfoxyde sont des exemples de solvants couramment utilisés. En règle générale, les solvants organiques ne doivent pas dépasser 1 % (v/v) et les solvants aqueux (salin ou eau) 10 % (v/v) dans le milieu de traitement final. L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel (éthanol ou acétone par exemple) doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité avec le produit chimique d'essai et le système d'essai, ainsi que de son absence de génotoxicité aux concentrations utilisées. En l'absence de telles données, il est important d'inclure dans l'essai des témoins non traités (voir annexe 1) afin de démontrer que le solvant choisi n'entraîne aucun effet délétère ou clastogène.

Mesure de la prolifération et de la cytotoxicité cellulaires et choix des concentrations d'essai

16. Lors de la détermination de la plus forte concentration de produit chimique d'essai à tester, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 22), une précipitation dans le milieu de culture (voir paragraphe 23), ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (voir paragraphe 5). Si le produit chimique d'essai provoque une modification marquée du pH du milieu au moment de son ajout, il est possible d'ajuster le pH par tamponnage du milieu de traitement final de manière à éviter les faux résultats positifs et à maintenir des conditions de culture appropriées.

17. Des mesures de la prolifération cellulaire sont effectuées pour s'assurer qu'un nombre suffisant de cellules traitées a atteint la mitose pendant l'essai et que les applications sont réalisées à des niveaux de cytotoxicité appropriés (voir paragraphes 18 et 22). La cytotoxicité doit être mesurée lors de l'expérience principale avec et sans système d'activation métabolique, au moyen d'un indicateur pertinent de mort et de croissance cellulaires. Un essai préliminaire visant à évaluer la cytotoxicité peut s'avérer

utile pour mieux cerner les concentrations à utiliser dans l'essai principal, mais il n'est pas obligatoire. S'il est réalisé, il ne doit pas remplacer la mesure de cytotoxicité effectuée dans le cadre de l'expérience principale.

18. La mesure du doublement relatif de la population (*Relative Population Doubling*, RPD) et celle de l'augmentation relative du nombre de cellules (*Relative increase in cell count*, RICC) sont des méthodes adaptées pour évaluer la cytotoxicité dans les essais de cytogénétique (13) (15) (35) (36) (55) (voir formules à l'annexe 2). En cas de traitement de longue durée et lorsque les prélèvements sont effectués au-delà de 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (soit plus de 3 cycles cellulaires au total), il se peut que le RPD sous-estime la cytotoxicité (37). Dans ces circonstances, la RICC pourrait constituer une meilleure mesure, mais l'évaluation de la cytotoxicité à l'aide du RPD après une durée équivalente à 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire fournit néanmoins une estimation précieuse.

19. Si l'indice mitotique (MI) mesure les effets cytotoxiques/cytostatiques sur les lymphocytes dans les cultures primaires, il est aussi influencé par le temps écoulé entre le début de l'exposition et le moment de la mesure, par le mitogène employé et par une éventuelle interruption du cycle. Toutefois, le MI constitue une mesure acceptable, car d'autres mesures de toxicité peuvent s'avérer laborieuses et peu pratiques, et ne pas forcément s'appliquer à la population cible de lymphocytes se développant en réponse à une stimulation par PHA.

20. Les paramètres de cytotoxicité recommandés sont la RICC et le RPD pour les lignées cellulaires, et le MI pour la culture primaire des lymphocytes; néanmoins, d'autres indicateurs (tels que l'intégrité cellulaire, l'apoptose, la nécrose et le cycle cellulaire) peuvent fournir d'autres informations utiles.

21. Il convient d'évaluer au moins trois concentrations d'essai (sans compter les témoins de solvant et les témoins positifs) remplissant les critères d'acceptabilité (cytotoxicité appropriée, nombre de cellules, etc.). Quel que soit le type de cellules (lignées cellulaires ou cultures primaires de lymphocytes), chacune des cultures réalisées en un seul ou plusieurs exemplaires peut être utilisée à chaque concentration d'essai. Alors que l'utilisation de cultures en double exemplaires est recommandé, l'utilisation de cultures en exemplaire unique est aussi acceptée à condition que le nombre total de cellules analysées par concentration reste identique qu'il s'agisse de cultures uniques ou de répliques. L'utilisation de cultures uniques est pertinent en particulier lorsqu'on évalue plus de 3 concentrations (voir paragraphe 31). Les résultats obtenus pour chacune des répliques (cultures réalisées en plusieurs exemplaires) à une concentration donnée peuvent être regroupés pour l'analyse des données (38). Pour les produits chimiques dont la cytotoxicité est faible ou nulle, des niveaux de concentrations espacés d'un facteur de 2 à 3 environ conviendront généralement. En cas de cytotoxicité, les concentrations d'essai retenues doivent couvrir une plage englobant la concentration produisant une cytotoxicité telle que décrite au paragraphe 22 et les concentrations pour lesquelles une cytotoxicité modérée, faible ou nulle est observée. De nombreux produits chimiques d'essai présentent des courbes concentration-réponse à forte pente et, pour obtenir des données dans le cadre d'une cytotoxicité faible et modérée ou étudier la relation dose-réponse en détail, il faudra donc utiliser des concentrations plus rapprochées et/ou plus de trois concentrations (cultures uniques ou répliques), notamment dans les cas où il est nécessaire de répéter l'expérience (voir paragraphe 47).

22. Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une cytotoxicité de 55 ± 5 % selon les paramètres de cytotoxicité recommandés (à savoir une réduction de la RICC et du RPD pour les lignées cellulaires et une réduction du MI pour les cultures primaires de lymphocytes à 45 ± 5 % du témoin négatif concomitant). Les résultats positifs présents uniquement dans la tranche la plus haute de la plage de cytotoxicité 55 ± 5 % doivent être interprétés avec prudence (13).

23. Pour les produits chimiques d'essai peu solubles qui ne sont pas cytotoxiques à des concentrations inférieures à la concentration insoluble la plus faible, la plus forte concentration analysée doit produire une turbidité ou un précipité visible à l'œil nu ou à l'aide d'un microscope inversé à la fin du traitement avec le produit chimique d'essai. Même si une cytotoxicité intervient au-delà de la concentration insoluble la plus faible, il est recommandé de tester une seule concentration produisant une turbidité ou un précipité visible, car de fausses réponses pourraient découler de ce précipité. À la concentration produisant un précipité, il convient de s'assurer que ce dernier n'interfère pas avec la conduite de l'essai (coloration ou analyse, par exemple). Il peut être utile de déterminer la solubilité dans le milieu de culture préalablement à l'essai.

24. Si aucun précipité ou aucune cytotoxicité limitante ne sont observés, la concentration d'essai maximale doit correspondre à la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/mL ou 2 µl/mL (39) (40) (41). Lorsque la composition du produit chimique d'essai n'est pas définie, par exemple dans le cas de substances de composition inconnue ou variable, de produits de réaction complexes ou de matériels biologiques (UVCB) (42), de produits extraits de l'environnement etc., il peut être nécessaire d'augmenter la concentration maximale (5 mg/mL par exemple), en absence de cytotoxicité suffisante, afin d'accroître la concentration de chacun des composants. Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (43).

Témoins

25. Des témoins négatifs concomitants (voir paragraphe 15), constitués uniquement du solvant dans le milieu de traitement et testés de la même façon que les cultures traitées, doivent être inclus pour chaque moment de récolte.

26. Des témoins positifs concomitants sont nécessaires pour démontrer la capacité du laboratoire à identifier les clastogènes dans les conditions du protocole d'essai utilisé, ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique exogène, le cas échéant. Le tableau 1 ci-dessous présente des exemples de témoins positifs. D'autres substances chimiques peuvent être utilisés comme témoins positifs, si cela est justifié. Étant donné que les essais *in vitro* de génotoxicité sur cellules de mammifères sont suffisamment normalisés, l'utilisation de témoins positifs peut être limitée à un clastogène nécessitant une activation métabolique. À condition qu'elle soit réalisée simultanément à l'essai non activé et sur la même durée de traitement, cette réponse de témoin positif unique démontrera à la fois l'activité du système d'activation métabolique et la réactivité du système d'essai. Un traitement de longue durée (sans S9) doit toutefois disposer de son propre témoin positif, étant donné que la durée du traitement sera différente de celle de l'essai ayant recours à une activation métabolique. Chaque témoin positif doit être utilisé à une ou plusieurs concentrations devant normalement donner lieu à une augmentation reproductible et détectable par rapport à la valeur de fond afin de démontrer la sensibilité du système d'essai (c'est-à-dire que les effets sont nets mais que l'identité des lames codées n'est pas évidente pour l'examineur) et la réponse ne doit pas être compromise par une cytotoxicité supérieure aux limites fixées dans cette ligne directrice.

Tableau 1. Substances chimiques de référence recommandées pour la vérification des compétences du laboratoire et pour la sélection des témoins positifs.

Catégorie	Substance chimique	Numéro CAS
1. Clastogènes actifs sans activation métabolique		
	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3
	Mitomycine C	50-07-7
	Oxyde de nitro-4-quinoléine	56-57-5
	Cytosine-arabino-side	147-94-4
2. Clastogènes nécessitant une activation métabolique		
	Benzo(a)pyrène	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0

MODE OPÉRATOIRE

Traitement avec le produit chimique d'essai

27. Les cellules en prolifération sont traitées avec le produit chimique d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique.

Délai de récolte des cultures

28. Pour une évaluation complète, laquelle serait nécessaire pour conclure à un résultat négatif, les trois conditions expérimentales suivantes doivent être respectées pour un traitement de courte durée avec et sans activation métabolique, et pour un traitement de longue durée sans activation métabolique (voir paragraphes 43, 44 et 45):

- Les cellules sont exposées au produit chimique d'essai sans activation métabolique pendant 3 à 6 heures puis sont prélevées à l'issue d'une période équivalente à environ 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (18).
- Les cellules sont exposées au produit chimique d'essai avec activation métabolique pendant 3 à 6 heures, puis sont prélevées à l'issue d'une période équivalente à environ 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (18).
- Les cellules sont exposées en continu sans activation métabolique jusqu'au moment du prélèvement à l'issue d'une période équivalente à environ 1.5 fois le cycle cellulaire normal. Certaines substances chimiques (analogues de nucléosides, par exemple) peuvent être détectées plus facilement en prolongeant le temps de traitement et de prélèvement au-delà de 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire (24).

Si l'une de ces conditions expérimentales entraîne une réponse positive, il n'est pas forcément nécessaire d'étudier les autres régimes de traitement.

Préparation des chromosomes

29. Les cultures de cellules sont traitées au Colcemid® ou à la colchicine pendant une période de une à trois heures avant la récolte. Chaque culture est récoltée et traitée séparément en vue de la préparation des chromosomes. La préparation des chromosomes passe par un traitement hypotonique des cellules, leur fixation et leur coloration (1). Il est possible que les cultures monocouches présentent des cellules mitotiques (reconnaissables à leur forme ronde et se détachant de la surface) à l'issue du traitement de 3 à 6 heures. Ces cellules se détachant facilement de la culture, elles risquent d'être emportées lors de l'élimination du milieu contenant le produit chimique d'essai. Si l'on constate une augmentation substantielle du nombre de cellules mitotiques par rapport aux témoins, ce qui indiquerait l'arrêt probable de la mitose, les cellules doivent être récoltées par centrifugation puis réintroduites dans les cultures afin d'éviter de perdre les cellules en phase de mitose, et présentant un risque d'aberration chromosomique, au moment de la récolte.

Analyse

30. Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées individuellement avant l'analyse au microscope pour déceler les aberrations chromosomiques. Le procédé de fixation provoquant souvent la perte de chromosomes pour une certaine fraction des cellules en métaphase, les cellules examinées doivent donc contenir un nombre de centromères égal au nombre modal ± 2 .

31. Il y a lieu d'examiner au moins 300 cellules en métaphase bien étalées par concentration et par témoin pour conclure qu'un produit chimique d'essai est clairement négatif (voir paragraphe 45). Les 300 cellules doivent être réparties équitablement entre les répliques, lorsque les cultures ont été réalisées en plusieurs exemplaires. Lorsque des cultures en un seul exemplaire sont utilisées pour chaque concentration (voir paragraphe 21), il y a lieu d'examiner au moins 300 cellules en métaphase bien étalées par culture. L'examen de 300 cellules présente l'avantage d'augmenter la puissance statistique de l'essai. En outre, il est rare d'observer des valeurs nulles (de l'ordre de 5 % seulement) (44). Le nombre de métaphases examinées peut être réduit lorsqu'un grand nombre de cellules présentant des aberrations chromosomiques est observé et s'il a été conclu que le produit chimique d'essai est clairement positif.

32. Les cellules présentant une/des aberration(s) chromosomique(s) structurale(s), lacunes comprises et non comprises, doivent être examinées. Les cassures et les lacunes sont définies à l'annexe 1 conformément à (45) (46). Il convient de consigner séparément les aberrations chromatidiques et chromosomiques et de les classer par sous-catégories (cassures, échanges). Les procédures en cours dans le laboratoire doivent assurer que l'analyse des aberrations chromosomiques est réalisée par des examinateurs qualifiés sous le contrôle de pairs si nécessaire.

33. Bien que l'essai soit destiné à détecter les aberrations chromosomiques structurales, il est important de rapporter la fréquence des cas de polyploïdie et d'endoreduplication lorsqu'ils se présentent. (Voir paragraphe 2.)

Compétence du laboratoire

34. Afin d'établir qu'il possède une expérience suffisante pour mener à bien l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit avoir réalisé une série d'expériences avec des substances chimiques positives de référence agissant selon des mécanismes variés, et avec plusieurs témoins négatifs (faisant appel à différents solvants/véhicules). Ces réponses de témoins positifs et négatifs doivent être cohérentes par

rapport à la littérature. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent une base de données historiques telle que définie au paragraphe 37.

35. Une sélection de substances chimiques utilisées comme témoins positifs (voir tableau 1, paragraphe 26) doit être testée dans le cadre de traitements de courte et de longue durée en l'absence d'activation métabolique, ainsi que dans le cadre d'un traitement de courte durée en présence d'une activation métabolique, l'objectif étant de démontrer que le laboratoire possède la compétence nécessaire pour détecter les substances clastogènes et pour déterminer l'efficacité du système d'activation métabolique. Il conviendra de définir une plage de concentrations des substances chimiques sélectionnées qui permette d'obtenir des augmentations reproductibles et liées à la concentration par rapport aux valeurs de fond, afin de démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai.

Données des témoins historiques

36. Le laboratoire doit établir:

- une plage et une distribution des témoins positifs historiques,
- une plage et une distribution des témoins négatifs (non traités, de solvant) historiques.

37. Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées, lorsqu'elles existent. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution (44) (47). La base de données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit à l'origine être constituée à partir d'au moins 10 expériences, sachant qu'il serait préférable qu'elle en compte au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques (cartes C ou cartes X-barre, par exemple (48)), afin de déterminer la variabilité de leurs données de témoins positifs et négatifs et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie (44). On trouve dans la littérature (47) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

38. Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée en termes de cohérence avec les bases de données des témoins historiques existantes du laboratoire. Toute incohérence majeure doit conduire à l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques.

39. Les données des témoins négatifs désignent l'incidence des cellules présentant des aberrations chromosomiques issues d'une seule culture ou de l'ensemble des cultures réalisées en plusieurs exemplaires, comme décrit au paragraphe 21. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire (44) (47). Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable, à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes et qu'il soit prouvé que le système d'essai est « sous contrôle » (voir paragraphe 37) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou humaine.

RÉSULTATS ET RAPPORT**Présentation des résultats**

40. Le pourcentage de cellules présentant une/des aberration(s) structurale(s) doit être évalué. Les aberrations chromatidiques et chromosomiques classées par sous-catégorie (cassure, échange) doivent être consignées séparément, avec leur nombre et leur fréquence pour les cultures traitées et les cultures témoins. Les lacunes sont enregistrées et rapportées séparément, mais elles ne sont pas incluses dans la fréquence totale des aberrations. Le pourcentage de cellules polyploïdes et/ou endoredupliquées est rapporté le cas échéant.

41. Il convient aussi d'effectuer des mesures parallèles de cytotoxicité et de les consigner pour toutes les cultures traitées et les témoins négatifs et positifs dans la ou les expériences principales sur les aberrations.

42. Les données doivent être indiquées individuellement pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Critères d'acceptabilité

43. L'acceptation de l'essai repose sur les critères suivants:

- Les données relatives aux témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins négatifs historiques du laboratoire (voir paragraphe 39).
- Les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 26) doivent induire des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants.
- Les critères de prolifération cellulaire dans le témoin de solvant doivent être remplis (paragraphe 17 et 18).
- Les trois conditions expérimentales ont été testées, à moins que l'une d'entre elles ait abouti à des résultats positifs (voir paragraphe 28).
- Un nombre adéquat de cellules et de concentrations sont analysables (paragraphe 31 et 21).
- Les critères de sélection de la concentration maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 22, 23 et 24.

Évaluation et interprétation des résultats

44. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 28):

- a) au moins une des concentrations d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,
- b) un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose,
- c) des résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple ; voir paragraphe 39).

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des aberrations chromosomiques dans les cellules de mammifères en culture dans ce système d'essai. Des

recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (49) (50) (51).

45. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 28):

- a) aucune concentration d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,
- b) un test de tendance approprié montre qu'il n'y a pas d'augmentation liée à la concentration,
- c) l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques (limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, par exemple ; voir paragraphe 39).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des aberrations chromosomiques dans les cellules de mammifères en culture dans ce système d'essai.

46. Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou négative.

47. Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, tel que décrit ci-dessus, ou afin d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'experts et/ou des investigations plus poussées. Il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires (le cas échéant) ou de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales modifiées (espacement des concentrations, autres conditions d'activation métabolique [concentration de S9 ou origine de S9], par exemple).

48. Dans de rares cas, même après des études complémentaires, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure à un résultat positif ou négatif. Dans ce cas, la réponse au produit chimique d'essai sera considérée comme équivoque.

49. Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que le produit chimique d'essai est capable d'inhiber les processus mitotiques et d'induire des aberrations chromosomiques numériques (52). Une augmentation du nombre de cellules présentant des chromosomes endoredupliques peut indiquer que le produit chimique d'essai est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (53) (54) (voir paragraphe 2). La fréquence des cellules polyploïdes et des cellules présentant des chromosomes endoredupliques doit donc être consignée séparément.

Rapport d'essai

50. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes :

Produit chimique d'essai :

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation, si c'est disponible
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue ;
- solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues ;
- mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant :

- apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude
- identification chimique : nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc

Substance multi-constituants, 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

Solvant :

- justification du choix du solvant ;
- le pourcentage de solvant présent dans le milieu de culture final devrait aussi être indiqué.

Cellules :

- type et source des cellules utilisées ;
- données sur le caryotype et raisons du choix du type de cellule utilisé ;
- absence de mycoplasmes, pour les lignées cellulaires ;
- pour les lignées cellulaires, informations sur la durée du cycle cellulaire, le temps de doublement ou l'indice de prolifération ;
- sexe, âge et toute autre information pertinente sur les donneurs de sang, sang complet ou lymphocytes isolés, mitogène employé ;
- nombre de passages, le cas échéant, pour les lignées cellulaires ;
- méthodes d'entretien des cultures, pour les lignées cellulaires ;
- nombre modal de chromosomes, pour les lignées cellulaires.

Conditions de l'essai :

- identité de l'agent de blocage de métaphase, sa concentration et la durée de contact ;
- concentration du produit chimique d'essai sous la forme de sa concentration finale dans le milieu de culture (par exemple en μg ou mg/mL ou mM du milieu de culture) ;
- justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris données concernant la cytotoxicité et les limites de solubilité, par exemple ;
- composition du milieu, concentration de CO_2 le cas échéant, degré d'humidité ;
- concentration (et/ou volume) de solvant et de produit chimique d'essai ajoutée au milieu de culture ;
- température d'incubation ;
- temps d'incubation ;
- durée du traitement ;
- délai de récolte après traitement ;
- densité cellulaire au moment de l'ensemencement, le cas échéant ;
- type et composition du système d'activation métabolique (source du S9, méthode de préparation du mélange S9, concentration ou volume de mélange S9 et de S9 dans le milieu de culture final, contrôles de la qualité du S9) ;
- substances témoins positifs et négatifs, concentrations finales pour chacune des conditions de traitement ;
- méthodes de préparation des lames et technique de coloration utilisées ;
- critères d'acceptabilité des essais ;

- critères utilisés pour examiner les aberrations ;
- nombre de métaphases analysées ;
- méthodes de mesure de la cytotoxicité ;
- toute information supplémentaire concernant la cytotoxicité et la méthode utilisée ;
- critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque ;
- méthodes utilisées pour déterminer le pH, l'osmolalité et la précipitation.

Résultats :

- nombre de cellules exposées et nombre de cellules récoltées pour chaque culture en cas de lignées cellulaires ;
- mesures de la cytotoxicité, par exemple RPD, RICC, MI, autres observations le cas échéant ;
- informations sur la durée du cycle cellulaire, le temps de doublement ou l'indice de prolifération en cas de lignées cellulaires ;
- signes de précipitation et moment de la détermination ;
- définition appliquée aux aberrations, y compris aux lacunes ;
- nombre de cellules examinées, nombre de cellules présentant des aberrations et types d'aberration, donnés séparément pour chaque culture traitée et témoin, incluant et excluant les lacunes ;
- modifications de la ploïdie (cellules polyploïdes et cellules présentant des chromosomes endoredupliés, indiquées séparément) le cas échéant ;
- relation concentration-réponse, si possible ;
- données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs (concentrations et solvants) concomitants ;
- données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs historiques, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts-types, limites de contrôle à 95 % pour la distribution, et nombre de données ;
- analyse statistique ; valeurs P le cas échéant.

Discussion des résultats.

Conclusions.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD, “Draft Introduction to the OECD guidelines on genetic toxicology testing and guidance on the selection and application of assays”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment. En préparation.
- (2) Evans, H.J. (1976), “Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens”, in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (3) Ishidate, M. Jr., T. Sofuni (1985), “The In Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture” in *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. et al. (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.
- (4) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (5) Muehlbauer, P.A. et al. (2008), “Improving dose selection and identification of aneugens in the in vitro chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.
- (6) OCDE (2014), *Essai n° 487 : Test du micronoyau in vitro sur cellules de mammifères*, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris.
- (7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.
- (8) Scott, D. et al. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.
- (9) Morita, T. et al. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.
- (11) Long, L.H. et al. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (12) Nesslany, F. et al. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitriлотriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.
- (13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.

- (14) Kirkland, D. et al. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1–256.
- (15) Greenwood, S. et al. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the in vitro assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36–44.
- (16) Hilliard, C.A. et al. (1998), Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316–326.
- (17) Hedner K. et al. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.
- (18) Ramsey M.J. et al. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.
- (19) Coecke S. et al. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.
- (20) Henderson, L. et al. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.
- (21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.
- (22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (23) Natarajan, A.T. et al. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Research*, Vol. 37/1, pp. 83-90.
- (24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In vitro, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.
- (25) Ong, T.-m. et al. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, Vol. 4/1, pp. 55-65.
- (26) Elliot, B.M. et al. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.

- (27) Matsushima, T. et al. (1976), "A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems", in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. et al. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (28) Galloway, S.M. et al. (1994). Report from Working Group on in Vitro Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.
- (29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 28/1, pp. 51-59.
- (30) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Disponible à l'adresse: <http://www.pops.int/>.
- (31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.
- (32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), "CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids", in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.
- (33) Zamora, P.O. et al. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (34) Asakura, M. et al. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.
- (35) Lorge, E. et al. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (36) Galloway, S. et al. (2011), Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.
- (37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.
- (38) Richardson, C. et al. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

- (39) OECD (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) [ENV/JM/TG\(2014\)17](#). Disponible à la demande.
- (40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.
- (41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.
- (42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>.
- (43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponible à l'adresse: <https://federalregister.gov/a/2012-13774>.
- (44) OECD (2014), "Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.
- (45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.
- (46) Scott, D. et al. (1990), "Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*", in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.
- (47) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.
- (49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
- (50) Galloway, S.M. et al. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.
- (51) Richardson, C. et al. (1989), "Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

- (52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two in vitro mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.
- (53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.
- (54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.
- (55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 312, pp. 139-149.

ANNEXE 1

DÉFINITIONS

Aberration de type chromatidique : lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique : lésion chromosomique structurale se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur un même site.

Aberration numérique : modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

Aberration structurale : modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope des cellules au stade de la métaphase et apparaissant sous la forme de délétions, fragmentations et modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

Aneuploïdie : tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes, d'un seul ou de plusieurs chromosomes, mais non d'un ou de plusieurs jeux de chromosomes (polyploïdie).

Apoptose : mort cellulaire programmée caractérisée par une succession d'étapes menant à la désintégration des cellules en particules membranaires qui sont ensuite éliminées par phagocytose ou par excrétion.

Augmentation relative du nombre de cellules (*Relative increase in cell count, RICC*) : augmentation du nombre de cellules dans les cultures exposées à un produit chimique par rapport aux cultures non traitées. Ratio exprimé en pourcentage.

Cassure de chromatide : interruption de la continuité d'une chromatide, manifestée par un défaut d'alignement clair de l'une des chromatides.

Clastogène : substance induisant des aberrations chromosomiques structurales dans des populations cellulaires ou des organismes eucaryotes.

Concentrations : désigne les concentrations finales du produit chimique d'essai dans le milieu de culture.

Cytotoxicité : pour les essais visés par la présente ligne directrice et utilisant des lignées cellulaires, la cytotoxicité correspond à une baisse du doublement relatif de la population (RPD) ou de l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) des cellules traitées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe 17 et annexe 2).

Pour les essais visés par la présente ligne directrice et utilisant des cultures primaires de lymphocytes, la cytotoxicité correspond à une baisse de l'indice mitotique (MI) des cellules exposées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe 18 et annexe 2).

Doublement relatif de la population (*Relative Population Doubling, RPD*) : augmentation du nombre de doublements de population dans les cultures exposées à un produit chimique par rapport aux cultures non traitées. Ratio exprimé en pourcentage.

Endoreduplication : processus selon lequel le noyau, après une période S de réplication de l'ADN, n'entre pas en mitose mais recommence une nouvelle période S. Il en résulte des chromosomes comptant 4, 8, 16,... chromatides.

Fraction S9 de foie : surnageant d'homogénat de foie centrifugé à 9 000 g (extrait de foie cru).

Génotoxique : terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, délétions, adduits, liaisons et modifications des nucléotides, réarrangements, mutations génétiques, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Indice mitotique (*Mitotic Index*, MI) : nombre de cellules en métaphase divisé par le nombre total de cellules dans une population ; une indication de la vitesse de prolifération.

Lacune chromatidique : région non colorée (lésion achromatique) d'une seule chromatide pour laquelle on observe un défaut d'alignement minime de la chromatide.

Mélange S9 : mélange de fraction S9 de foie et de cofacteurs nécessaires à l'activité des enzymes métaboliques.

Mitose : division du noyau cellulaire, généralement décomposée en prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase.

Mutagène : qui produit une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Polyploïdie : aberrations chromosomiques numériques dans des cellules ou des organismes, impliquant un ou plusieurs jeux de chromosomes et non un ou plusieurs chromosomes isolés (aneuploïdie).

Prolifération cellulaire : augmentation du nombre de cellules résultant de la division cellulaire mitotique.

Statut p53 : la protéine p53 intervient dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN. Les cellules déficientes en protéine p53 fonctionnelle, incapables d'arrêter le cycle cellulaire ou d'éliminer les cellules lésées par le biais de l'apoptose ou d'autres mécanismes (induction de la réparation de l'ADN, par exemple) liés aux fonctions de p53 en réponse à des lésions de l'ADN, devraient théoriquement être davantage sujettes aux mutations génétiques ou aux aberrations chromosomiques.

Témoin de solvant : terme générique désignant les cultures témoins recevant uniquement le solvant utilisé pour dissoudre le produit chimique d'essai.

Témoins non traités : cultures ne recevant aucun traitement (ni produit chimique d'essai ni solvant) mais préparées parallèlement et de la même façon que les cultures exposées au produit chimique d'essai.

ANNEXE 2

FORMULES POUR L'ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ

Indice mitotique (MI) :

$$\text{MI (\%)} = \frac{\text{Nombre de cellules mitotiques}}{\text{Nombre total de cellules examinées}} \times 100$$

L'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) et le doublement relatif de la population (RPD) sont des mesures recommandées, qui tiennent compte de la proportion de cellules ayant effectué une division cellulaire.

$$\text{RICC (\%)} = \frac{\text{(Augmentation du nombre de cellules dans les cultures traitées (final – initial))}}{\text{(Augmentation du nombre de cellules dans les cultures témoins (final – initial))}} \times 100$$

$$\text{RPD (\%)} = \frac{\text{(Nombre de doublements de population dans les cultures traitées)}}{\text{(Nombre de doublements de population dans les cultures témoins)}} \times 100$$

où :

Doublement de population = $[\log (\text{nombre de cellules post-application} \div \text{nombre de cellules initial})] \div \log 2$

Par exemple, une RICC ou un RPD de 53 % indique une cytotoxicité/cytostase de 47 % et une cytotoxicité/cytostase de 55 % mesurée par le MI signifie que le MI réel représente 45 % du témoin.

Quoi qu'il en soit, il convient de mesurer le nombre de cellules avant traitement, qui doit être identique dans les cultures traitées et les cultures témoins négatives.

Le RCC (à savoir le ratio nombre de cellules dans les cultures traitées / nombre de cellules dans les cultures témoins) était utilisé auparavant comme paramètre de cytotoxicité, mais n'est plus recommandé car il peut induire une sous-estimation de la cytotoxicité.

Dans les cultures témoins négatives, le doublement de la population doit être compatible avec l'obligation de prélever des cellules à l'issue d'une période équivalente à environ 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement, et l'indice mitotique doit être assez élevé pour obtenir un nombre suffisant de cellules en mitose et calculer de façon fiable une réduction de 50 %.