

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

TEST DU MICRONOYAU *IN VITRO* SUR CELLULES DE 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 487 originale a été adoptée en 2010, puis révisée dans le cadre d'une refonte complète des Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de génotoxicité et pour tenir compte des connaissances acquises après plusieurs années d'expérience de cet essai et de l'interprétation des données. La présente Ligne directrice 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 génotoxicité (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. Le test du micronoyau *in vitro* (MNvit) est un essai de génotoxicité consistant à mettre en évidence d'éventuels micronoyaux (MN) dans le cytoplasme de cellules en interphase. Les micronoyaux peuvent avoir pour origine des fragments de chromosomes acentriques (c'est-à-dire dépourvus de centromère) ou des chromosomes entiers incapables de migrer vers les pôles de la cellule au cours de l'anaphase. Par conséquent, l'essai MNvit est une méthode *in vitro* qui, grâce à sa capacité de mise en évidence d'agents aneugènes et clastogènes, constitue un outil de base complet pour l'étude *in vitro* du potentiel de lésions chromosomiques (2) (3) dans des cellules ayant effectué une mitose pendant ou après l'exposition au produit chimique d'essai (voir paragraphe 13 pour des informations plus détaillées). Contrairement aux aberrations chromosomiques observées dans les cellules en métaphase, qui ne sont pas forcément transmises, les micronoyaux sont des lésions transmises aux cellules-filles. Dans les deux cas, les changements peuvent être incompatibles avec la survie des cellules.

3. La présente Ligne directrice autorise l'utilisation de protocoles incluant ou non la cytochalasine B (cytoB), un inhibiteur de polymérisation de l'actine. L'ajout de cytoB avant la mitose donne lieu à des cellules binucléées, ce qui permet l'identification et l'analyse des micronoyaux uniquement dans les cellules ayant effectué une mitose (4) (5). Cette Ligne directrice autorise également l'utilisation de protocoles ne mettant pas en jeu le blocage de la cytokinèse, à condition de pouvoir démontrer que la population cellulaire analysée a bien effectué une mitose.

4. Outre qu'il permet d'identifier des substances chimiques induisant la formation de micronoyaux, le test MNvit, associé au marquage immunochimique des kinétochores ou à l'hybridation avec sondes

centromériques/téломériques [hybridation fluorescente *in situ* (FISH)], peut apporter des informations supplémentaires sur les mécanismes à l'origine des lésions chromosomiques et de la formation de micronoyaux (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Ces procédures de marquage et d'hybridation peuvent être suivies lorsqu'une augmentation de la formation de micronoyaux est constatée et que l'investigateur souhaite déterminer si cette augmentation est le résultat d'événements clastogènes et/ou aneugènes.

5. Dans la mesure où les micronoyaux présents dans les cellules en interphase peuvent être évalués de façon relativement objective, le personnel du laboratoire a seulement besoin de déterminer le nombre de cellules binucléées en cas d'utilisation de la cytoB ainsi que l'incidence des cellules micronucléées dans tous les cas. L'examen des lames peut donc être relativement rapide, et l'analyse peut être automatisée. Chaque traitement permettant l'examen non plus de centaines mais de milliers de cellules, la puissance de l'essai s'en trouve accrue. Enfin, étant donné que les micronoyaux peuvent être issus de chromosomes retardataires, l'essai peut permettre de détecter la présence d'agents inducteurs d'aneuploïdie, difficiles à étudier lors de tests d'aberration chromosomique classiques, tels que celui décrit dans la Ligne directrice de l'OCDE 473 (18). Toutefois, l'essai MNvit décrit dans la présente Ligne directrice ne permet pas de distinguer les substances chimiques modifiant le nombre de chromosomes et/ou la ploïdie de ceux induisant la clastogénicité sans avoir recours à des techniques spécifiques, telles que la méthode FISH citée au paragraphe 4.

6. L'essai MNvit est fiable et peut s'appliquer à plusieurs types de cellules, en présence ou en l'absence de cytoB. La validité de l'essai MNvit est attestée par de nombreuses données, et ce avec l'utilisation de différentes lignées cellulaires (cultures de lignées cellulaires ou de cellules primaires) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Ces données proviennent notamment des études internationales de validation coordonnées par la Société française de toxicologie génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) et des rapports de l'International Workshop on Genotoxicity Testing (5) (17). Les données disponibles ont en outre fait l'objet d'une nouvelle évaluation lors d'une étude de validation rétrospective fondée sur le poids de la preuve, réalisée par le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (CEVMA) de la Commission européenne (CE), et la méthode d'essai a été déclarée scientifiquement valable par le comité consultatif scientifique du CEVMA (ESAC) (37) (38) (39).

7. Le test de micronoyaux *in vitro* sur cellules de mammifères peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires ou des cultures de cellules primaires d'origine humaine ou de rongeurs. Dans la mesure où la fréquence des micronoyaux généralement constatée pour un type de cellule aura une influence sur la sensibilité de l'essai, il est recommandé d'utiliser des types de cellules pour lesquelles la fréquence habituelle de formation de micronoyaux est stable et définie. Les cellules employées sont choisies en fonction de leur capacité à bien se développer en culture, de la stabilité de leur caryotype (notamment leur nombre de chromosomes) et de la fréquence spontanée de micronoyaux (40). 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 risques chimiques, du statut 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 de micronoyaux, sachant que les connaissances évoluent dans ce domaine.

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

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

9. 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 ne reflétant pas la génotoxicité des produits chimiques d'essai. Ces conditions peuvent être une modification du pH (41) (42) (43) ou de l'osmolalité, une interaction avec le milieu de culture cellulaire (44) (45) ou une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 29).

10. Afin que l'analyse de l'induction de micronoyaux soit valable, il est essentiel que la mitose se soit produite aussi bien dans les cultures traitées et que dans les cultures non traitées. Pour que son intérêt soit maximal, l'examen des micronoyaux est effectué dans les cellules ayant achevé une mitose durant ou après l'application du produit chimique d'essai. Pour les nanomatériaux manufacturés, il est nécessaire d'apporter certaines adaptations spécifiques à cette Ligne directrice, mais ces adaptations ne sont pas décrites dans ce document.

11. 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

12. 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 19).

13. Durant ou après l'exposition au produit chimique d'essai, les cellules sont mises en culture pendant une période suffisante pour que la lésion chromosomique ou d'autres effets sur le cycle cellulaire / la division cellulaire conduisent à la formation de micronoyaux dans les cellules en interphase. Le produit chimique d'essai est normalement présent au cours de la mitose pour qu'il y ait induction d'une aneuploïdie. Les cellules récoltées en interphase sont teintées et soumises à analyse en vue de la détection de micronoyaux. En principe, l'examen des micronoyaux ne devrait être réalisé que dans les cellules ayant effectué une mitose durant l'exposition au produit chimique d'essai, ou pendant la période qui suit le traitement, si l'essai la prévoit. Dans les cultures ayant été exposées à un agent de blocage de la cytokinèse, il suffit de procéder à l'examen des cellules binucléées. En l'absence d'agent de blocage de la cytokinèse, il importe de démontrer que les cellules analysées ont selon toute vraisemblance subi une mitose, d'après l'augmentation de la population cellulaire, pendant ou après l'exposition au produit chimique d'essai. Pour tous les protocoles, il convient de démontrer qu'une prolifération cellulaire a eu lieu tant dans les cultures témoins que dans les cultures traitées. Le degré de cytotoxicité ou de cytotase induit par le produit chimique d'essai est évalué pour toutes les cultures dans lesquelles est réalisé l'examen des micronoyaux.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Cellules

14. Il est possible d'utiliser des cultures primaires de lymphocytes du sang périphérique humain ou d'autres mammifères (7) (20) (46) (47) et plusieurs lignées cellulaires issues de rongeurs telles que CHO,

V79, CHL/IU, ainsi que les cellules L5178Y ou des lignées cellulaires humaines telles que les TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (voir paragraphe 6). D'autres lignées cellulaires telles que HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2 (52) (53), A549 et les cellules embryonnaires primaires de hamster doré (54) ont été utilisées pour des tests du micronoyau, mais elles n'ont pas encore été validées complètement. Par conséquent, le recours à ces types de lignées cellulaires doit être justifié via la démonstration de leur performance pour l'essai, ainsi qu'il est indiqué dans la section sur les critères d'acceptabilité. La CytoB est réputée pouvoir influencer sur la croissance des cellules L5178Y et n'est donc pas recommandée avec cette lignée cellulaire (23). 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 d'origine humaine, prélevées dans le respect des principes éthiques et de la réglementation en la matière.

15. 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 cellules micronucléées, ceci afin de garantir que cette incidence soit faible et homogène. L'incidence des cellules micronucléées augmente avec l'âge, et cette tendance est plus marquée chez la femme que chez l'homme (55). 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 phases 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 avec le produit chimique d'essai n'est pas recommandée, mais peut être acceptable si elle est justifiée.

Milieu et conditions de culture

16. 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 de 37°C) appropriées pour les cultures. La stabilité du caryotype (mode du nombre de chromosomes) et l'absence de contamination par des mycoplasmes sont vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires, 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.

Préparation des cultures

17. 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).

18. 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 et à la cytoB.

Activation métabolique

19. 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, à moins qu'un autre système soit justifié, 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 (56) (57) ou un mélange de phénobarbital et de β -naphthoflavone (58) (59) (60). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (61) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Aroclor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (58) (59) (60). 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 (62). 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

20. Les produits chimiques solides à tester sont préparés dans un solvant approprié puis, le cas échéant, dilués avant application. Les produits chimiques liquides peuvent être ajoutés directement ou après dilution au système d'essai. Les produits chimiques gazeux ou volatils nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients hermétiquement clos (63) (64) (65). 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*

21. Le solvant doit être choisi de manière à optimiser la solubilité des produits chimiques d'essai, sans engendrer d'effets néfastes sur la conduite de l'essai, et notamment 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 (DMSO) sont des solvants couramment utilisés. En règle générale, les solvants organiques ne doivent pas dépasser 1 % v/v. Si la cytoB est dissoute dans du DMSO, la quantité totale de solvant organique utilisée à la fois pour le produit chimique d'essai et pour la cytoB ne doit pas dépasser 1 % (v/v) ; sinon, on aura recours à des témoins non traités afin de vérifier que le pourcentage de solvant organique n'a pas d'effet néfaste. Les solvants aqueux (solution saline ou eau) ne doivent pas dépasser 10 % (v/v) dans le milieu de traitement final. L'emploi d'un solvant 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) ainsi que des témoins de solvant afin de démontrer que le solvant choisi n'entraîne pas d'effets délétères ou chromosomiques (aneuploïdie ou clastogénicité, par exemple).

Utilisation de la cytoB comme agent de blocage de la cytokinèse

22. Il est essentiel, pour garantir l'efficacité du test MNvit, que les cellules sur lesquelles est réalisé l'examen aient bien effectué une mitose durant le traitement ou pendant la période d'incubation qui suit le

traitement, le cas échéant. L'examen des micronoyaux doit donc être limité aux cellules ayant effectué une mitose pendant ou après le traitement. La cytoB est l'agent le plus couramment utilisé pour bloquer la cytokinèse, car elle inhibe l'assemblage de l'actine, empêchant la séparation des cellules-filles après la mitose, d'où la formation de cellules binucléées (6) (66) (67). L'effet du produit chimique d'essai sur la cinétique de prolifération cellulaire peut être mesuré de façon concomitante, en cas de recours à la cytoB. L'usage de cytoB comme agent de blocage de la cytokinèse est indiqué lors de l'utilisation de lymphocytes humains, car la durée du cycle cellulaire est variable selon les donneurs et parce que tous les lymphocytes ne réagissent pas à la stimulation par la PHA. La cytoB n'est pas obligatoire pour les autres types de cellules s'il peut être établi que ces cellules ont subi une division tel que décrit au paragraphe 27. En outre, la cytoB n'est généralement pas utilisée lorsque la formation de micronoyaux dans les échantillons est évaluée par le biais de la cytométrie en flux.

23. Pour chaque type de cellule, le laboratoire détermine la concentration de cytoB permettant d'obtenir la fréquence optimale de cellules binucléées dans les cultures témoins de solvant, et démontre qu'elle produit suffisamment de cellules binucléées pour que l'on puisse procéder à une analyse. La concentration appropriée de cytoB se situe habituellement entre 3 et 6 µg/mL (19).

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

24. Lors de la détermination de la plus forte concentration du produit chimique d'essai, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 29), une précipitation dans le milieu de culture (voir paragraphe 30) ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (voir paragraphe 9). 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.

25. Des mesures de la prolifération cellulaire sont effectuées pour s'assurer qu'un nombre suffisant de cellules traitées a effectué une mitose pendant l'essai et que les applications sont réalisées à des niveaux de cytotoxicité appropriés (voir paragraphe 29). La cytotoxicité doit être mesurée lors de l'expérience principale avec et sans activation métabolique, au moyen d'un indicateur pertinent de mort et de croissance cellulaires (voir paragraphes 26 et 27). 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.

26. L'application de cytoB sur les cultures et la mesure des fréquences relatives de cellules mononucléées, binucléées et multinucléées dans chaque culture offrent un moyen précis de quantifier l'effet d'un traitement sur la prolifération cellulaire et l'activité cytotoxique ou cytotatique (6) et de s'assurer que seules les cellules ayant effectué une mitose pendant ou après l'application sont observées au microscope. Il est conseillé de mesurer l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (*cytokinesis-block proliferation index*, CBPI) (6) (27) (68) ou l'indice de réplication (*Replication Index*, RI) à partir d'au moins 500 cellules par culture (voir les formules à l'annexe 2) pour estimer l'activité cytotoxique et cytotatique d'un traitement en comparant les valeurs obtenues pour les cultures traitées et les cultures témoins. L'évaluation d'autres indicateurs de cytotoxicité (intégrité cellulaire, apoptose, nécrose, numération des cellules en métaphase, cycle cellulaire, etc.) peut fournir des informations utiles mais ne doit pas remplacer le CBPI ou le RI.

27. Dans les études sans cytoB, il est nécessaire de démontrer que les cellules mises en culture se sont divisées, de sorte qu'une proportion importante des cellules examinées aient effectué une division

cellulaire durant ou après l'exposition au produit chimique d'essai, faute de quoi on risque de produire de fausses réponses négatives. La mesure du doublement relatif de la population (*Relative Population Doubling*, RPD) ou de l'augmentation relative du nombre de cellules (*Relative increase in cell count*, RICC) est recommandée pour évaluer l'activité cytotoxique et cytostatique d'un traitement (17) (68) (69) (70) (71) (voir formules à l'annexe 2). Lorsque les prélèvements s'étalent sur une longue durée (par exemple, lorsque la durée du traitement équivaut à 1.5 à 2 fois la durée normale du cycle cellulaire et que la récolte a lieu à l'issue d'une durée équivalente après le traitement, ce qui engendre des moments d'échantillonnage allant au-delà de 3 à 4 fois la durée normale du cycle cellulaire au total (voir paragraphes 38 et 39), il se peut que le RPD sous-estime la cytotoxicité (71). Dans ces circonstances, la RICC pourrait constituer une meilleure mesure, mais l'évaluation de la cytotoxicité après une durée équivalente à 1.5 à 2 fois la durée normale du cycle cellulaire fournit néanmoins une estimation précieuse. L'évaluation d'autres marqueurs de cytotoxicité ou de cytostase (intégrité cellulaire, apoptose, nécrose, numération des cellules en métaphase, indice de prolifération, cycle cellulaire, ponts nucléoplasmiques ou bourgeons nucléaires, etc.) peut fournir d'autres informations utiles mais ne doit pas remplacer le RPD ni la RICC.

28. Il convient d'évaluer au moins trois concentrations d'essai (sans compter les témoins positifs et les témoins de solvant) 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 pour chaque concentration d'essai. Alors que l'utilisation de cultures en double exemplaires est recommandée, 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 lorsque quand on évalue plus de 3 concentrations (voir paragraphes 44-45). Les résultats obtenus pour chacune des répliques (cultures réalisées en plusieurs exemplaires) à une concentration donnée peuvent être regroupés pour l'analyse des données. Pour les produits chimiques dont la cytotoxicité est faible ou nulle, des niveaux de concentration séparés par 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 29 et les concentrations pour lesquelles une cytotoxicité modérée, faible ou nulle est observée. De nombreux produits chimiques d'essai présentent des courbes de 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 60).

29. 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 sans cytoB et une réduction du CBPI et de l'indice de réplication quand la cytoB est utilisée à 45 ± 5 % du témoin négatif concomitant) (72). Les résultats positifs présents uniquement dans la tranche la plus haute de la plage de cytotoxicité 55 ± 5 % doivent être interprétés avec prudence (71).

30. 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. A 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.

31. 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 (73) (74) (75). 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 (76), de produits extraits de l'environnement, etc., il peut être nécessaire d'augmenter la concentration maximale (5 mg/mL par exemple), en l'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 (93).

Témoins

32. Des témoins négatifs concomitants (voir paragraphe 21), constitués uniquement du solvant dans le milieu de traitement et testés de la même façon que les cultures traitées, doivent être inclus à tous les moments de récolte.

33. Des témoins positifs concomitants sont nécessaires pour démontrer la capacité du laboratoire à identifier les clastogènes et les aneugènes dans les conditions du protocole d'essai utilisé, ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique exogène, le cas échéant. Des exemples de témoins positifs figurent dans le tableau 1 ci-dessous. D'autres substances chimiques peuvent être utilisées comme témoins positifs, si cela est justifié.

34. À l'heure actuelle, aucun aneugène connu ne nécessite une activation métabolique pour présenter une activité génotoxique (17). Étant donné que les essais *in vitro* de génotoxicité sur cellules de mammifères sont suffisamment normalisés en ce qui concerne les traitements parallèles de courte durée effectués avec et sans activation métabolique pendant la même durée de traitement, l'utilisation de témoins positifs peut être limitée à un clastogène nécessitant une activation métabolique. Dans ce cas, une seule réponse clastogène dans un témoin positif démontrera à la fois l'activité du système d'activation métabolique et la réactivité du système d'essai. Toutefois, un traitement de longue durée (sans S9) doit 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. Si un clastogène est sélectionné comme témoin positif unique pour le traitement de courte durée avec et sans activation métabolique, un aneugène devra être sélectionné pour le traitement de longue durée sans activation métabolique. Les témoins positifs tant pour la clastogénicité que pour l'aneugénicité sont utilisés pour des cellules métaboliquement compétentes ne nécessitant pas de préparation S9.

35. 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 arabinoside	147-94-4
2. Clastogènes nécessitant une activation métabolique		
	Benzo(a)pyrène	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0
3. Aneugènes		
	Colchicine	64-86-8
	Vinblastine	143-67-9

MODE OPÉRATOIRE

Déroulement du traitement

36. Afin d'augmenter au maximum la probabilité de détecter une action aneugène ou clastogène à un stade précis du cycle cellulaire, il importe qu'un nombre suffisant de cellules représentant la totalité des stades de leur cycle cellulaire soit traité avec le produit chimique d'essai. Toutes les applications débutent et s'achèvent pendant la phase de croissance exponentielle des cellules, et les cellules poursuivent leur croissance jusqu'au moment de l'échantillonnage. Le déroulement du traitement pour les lignées cellulaires et les cultures de cellules primaires peut donc différer quelque peu de celui appliqué pour les lymphocytes qui nécessitent une stimulation mitogène pour débiter leur cycle cellulaire (17). En ce qui concerne les lymphocytes, l'approche la plus efficace consiste à commencer le traitement avec le produit chimique d'essai 44 à 48 heures après la stimulation par la PHA, au moment où les cellules se divisent de manière asynchrone (6).

37. Les données publiées (19) indiquent que la plupart des aneugènes et clastogènes sont détectés à l'issue d'une application de courte durée, comprise entre 3 et 6 heures, en présence et en l'absence de préparation S9, suivie du retrait du produit chimique d'essai et d'une période de croissance équivalente à 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire (7).

38. Toutefois, 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 56, 57 et 58) :

- 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 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (19),
- 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 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement (19),
- Les cellules sont exposées en continu sans activation métabolique jusqu'au moment du prélèvement à l'issue d'une période équivalente à 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire.

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

S'il est connu ou supposé que le produit chimique d'essai affecte la durée du cycle cellulaire (par exemple si l'essai porte sur des analogues de nucléosides), notamment en ce qui concerne les cellules compétentes en p53 (35) (36) (77), les périodes d'échantillonnage et de récupération peuvent être prolongées d'une durée équivalente à 1.5 à 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire (soit au total 3.0 – 4.0 cycles cellulaires après le début des traitements de courte durée et de longue durée).

Ces différents choix sont à faire en fonction des craintes d'interaction entre le produit chimique d'essai et la cytoB.

En cas de recours à des périodes d'échantillonnage étendues (soit une durée de mise en culture équivalente au total à 3.0 – 4.0 cycles cellulaires), il faut veiller à ce que les cellules se divisent toujours activement. En ce qui concerne les lymphocytes, par exemple, la croissance exponentielle peut diminuer à partir de 96 heures après la stimulation et les cultures cellulaires monocouches peuvent devenir confluentes.

39. Les déroulements proposés pour le traitement des cellules sont résumés dans le tableau 2. Ces déroulements de traitement généraux peuvent être modifiés (et doivent être justifiés) en fonction de la stabilité et de la réactivité du produit chimique d'essai, ou des caractéristiques de croissance des cellules utilisées.

Tableau 2. Traitement des cellules et temps de récolte pour le test MNvit

Lymphocytes, cellules primaires et lignées cellulaires traités avec application de cytoB	Traitement de courte durée (avec S9)	Traiter pendant 3 à 6 heures en présence de S9 ; éliminer la préparation S9 et le milieu de traitement ; ajouter du milieu frais et de la cytoB ; récolter à l'issue de 1.5 – 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement.
	Traitement de courte durée (sans S9)	Traiter pendant 3 à 6 heures ; éliminer le milieu de traitement ; ajouter du milieu frais et de la cytoB ; récolter à l'issue de 1.5 – 2.0 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement.

	Traitement prolongé (sans S9)	Traiter pendant 1.5 – 2 fois la durée normale du cycle cellulaire en présence de cytoB ; récolter à la fin de la période de traitement.
Lignées cellulaires traitées <u>sans</u> application de cytoB (Mode de traitement identique à celui décrit ci-dessus, sauf que l'on n'ajoute pas de cytoB)		

40. 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 de micronoyaux / d'aberration chromosomique, au moment de la récolte.

Récolte des cellules et préparation des lames

41. Chaque culture doit faire l'objet d'une récolte et d'un traitement séparés. La préparation des cellules peut comporter un traitement hypotonique, mais cette étape n'est pas indispensable si les cellules sont correctement étalées d'une autre façon. Différentes techniques peuvent être employées pour la préparation des lames, à condition que les préparations cellulaires obtenues pour l'examen soient de très bonne qualité. On retiendra les cellules dotées d'une membrane intacte et d'un cytoplasme intact pour permettre la détection d'éventuels micronoyaux et (dans la méthode du blocage de la cytokinèse) le repérage fiable des cellules binucléées.

42. Les lames peuvent être colorées par différentes méthodes, au Giemsa ou à l'aide de colorants fluorescents spécifiques de l'ADN, par exemple. Le recours à des 'utilisation de colorants fluorescents appropriés [par exemple, l'acridine orange (78) ou l'Hoechst 33258 avec la pyronine-Y (79)] permet d'éliminer une partie des artefacts associés avec l'utilisation d'un colorant non spécifique de l'ADN. Les anticorps anti-kinétochore, la méthode FISH associée à des sondes ADN pancentromériques ou encore le marquage *in situ* par amorçage à l'aide d'amorces pancentromériques, avec un colorant de contraste de l'ADN approprié, peuvent être utilisés pour identifier le contenu des micronoyaux (les chromosomes entiers seront colorés tandis que les fragments de chromosomes acentriques ne le seront pas) si les informations d'ordre mécanistique concernant leur formation présentent de l'intérêt (16) (17). D'autres méthodes de discrimination des effets clastogènes et aneugènes peuvent être utilisées, à condition que leur efficacité ait été prouvée et validée. Ainsi, pour certaines lignées cellulaires, la mesure des noyaux sub-2N en tant qu'événements hypodiploïdes à l'aide de techniques telles que l'analyse d'images, la cytométrie à balayage laser ou la cytométrie en flux pourrait également fournir des informations utiles (80) (81) (82). Les observations morphologiques des noyaux pourraient aussi donner des indications sur une aneuploïdie éventuelle. De plus, un essai d'aberrations chromosomiques dans les cellules en métaphase, portant de préférence sur le même type de cellules et suivant un protocole d'une sensibilité comparable, pourrait également se révéler utile pour déterminer si les micronoyaux sont dus à une cassure chromosomique (sachant qu'une perte chromosomique ne serait pas détectée au cours de l'essai d'aberration chromosomique).

Analyse

43. Toutes les lames, y compris celles des témoins de solvant et des témoins non traités (s'il y en a) et positifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope des fréquences de micronoyaux. Il convient d'employer des techniques appropriées pour contrôler les biais ou dérives en cas d'utilisation d'un système d'analyse automatique tel que la cytométrie en flux, la cytométrie à balayage laser ou l'analyse d'images. Quelle que soit la plate-forme automatisée utilisée pour examiner les micronoyaux, le CBPI, le RI, le RPD et la RICC doivent être évalués simultanément.

44. Dans les cultures traitées à la cytoB, la fréquence des micronoyaux est analysée dans un minimum de 2 000 cellules binucléées par concentration et par témoin (83), réparties équitablement entre les répliques, lorsque les cultures ont été réalisées en plusieurs exemplaires ou répliques. Lorsque des cultures en un seul exemplaire sont utilisées pour chaque concentration (voir paragraphe 28), il y a lieu d'examiner au moins 2 000 cellules binucléées par culture (83). Si le nombre de cellules binucléées disponibles pour l'examen de chaque concentration est largement inférieur à 1 000 par culture (pour les cultures dupliquées) ou à 2 000 (pour une culture en un seul exemplaire), et si aucune augmentation significative du nombre de micronoyaux n'est détectée, l'essai devra être renouvelé sur un nombre plus important de cellules, ou à des concentrations moins cytotoxiques, suivant la situation. Il convient également de veiller à ne pas examiner les cellules binucléées ayant une forme irrégulière ou dont les deux noyaux présentent une différence de taille trop importante. En outre, les cellules binucléées ne doivent pas être confondues avec des cellules multinucléées mal étalées. Les cellules possédant plus de deux noyaux principaux ne sont pas analysées, car la fréquence de référence des micronoyaux est susceptible d'être plus élevée dans ce type de cellules (84). L'examen des cellules mononucléées peut être envisagé s'il s'avère que le produit chimique d'essai interfère avec l'action de la cytoB. Dans ce cas, il peut se révéler utile de répéter l'essai sans cytoB. L'examen des cellules mononucléées outre celui des cellules binucléées pourrait fournir des informations utiles (85) (86), mais n'est pas obligatoire.

45. En ce qui concerne les lignées cellulaires, lorsque l'essai est réalisé sans cytoB, l'examen des micronoyaux doit porter sur un minimum de 2 000 cellules par concentration d'essai (83) et par témoin, 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 28), il y a lieu d'examiner au moins 2 000 cellules binucléées par culture. Si le nombre de cellules binucléées disponibles pour l'examen de chaque concentration est largement inférieur à 1 000 par culture (pour les cultures dupliquées) ou à 2 000 (pour une culture en un seul exemplaire), et si aucune augmentation significative du nombre de micronoyaux n'est détectée, l'essai devra être renouvelé sur un nombre plus important de cellules, ou à des concentrations moins cytotoxiques, suivant la situation.

46. Lorsque l'essai est réalisé en présence de cytoB, il convient de déterminer un CBPI ou un indice de réplication (RI) afin d'évaluer la prolifération cellulaire (voir annexe 2), en utilisant 500 cellules au moins par culture. Lorsque les traitements sont effectués en l'absence de cytoB, il est essentiel de faire la preuve que les cellules en culture se sont divisées (voir paragraphes 24 à 28).

Compétence du laboratoire

47. Afin d'acquérir une expérience suffisante de 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 (au moins un avec activation métabolique et un sans activation métabolique, et un agissant selon un mécanisme aneugène, et sélectionné parmi les substances chimiques énumérées au tableau 1) et avec plusieurs témoins négatifs (y compris des cultures non traitées et divers 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 d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 49 à 52.

48. Une sélection de substances chimiques utilisées comme témoins positifs (voir tableau 1) 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 aneugènes, déterminer l'efficacité du système d'activation métabolique et démontrer la pertinence des procédures d'examen (analyse visuelle au microscope, cytométrie en flux, cytométrie à balayage laser ou analyse d'images). 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 historiques

49. 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.

50. 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 (87) (88). 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 utiliser des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques (cartes C ou cartes X-barre, par exemple (88)) afin de déterminer la variabilité de leurs données de témoins positifs et négatifs et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie (83). On trouve dans la littérature (87) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser les données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

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

52. Les données des témoins négatifs désignent l'incidence des cellules micronucléées issues d'une seule culture ou de l'ensemble des cultures réalisées en plusieurs exemplaires, comme décrit au paragraphe 28. 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 (87) (88). 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 50) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou d'erreur humaine.

RÉSULTATS ET RAPPORT*Présentation des résultats*

53. Lorsque la technique du blocage de la cytokinèse est employée, seules les fréquences des cellules binucléées présentant des micronoyaux (indépendamment du nombre de micronoyaux par cellule) sont utilisées pour évaluer l'induction de micronoyaux. L'analyse des cellules présentant un ou plusieurs micronoyaux peut être rapportée séparément ; elle peut apporter des informations utiles, mais n'est pas obligatoire.

54. Il convient d'effectuer des mesures parallèles de cytotoxicité et/ou de cytostase pour toutes les cultures traitées et les témoins négatifs et positifs (16). On calculera également le CBPI ou l'indice de réplication (RI) pour toutes les cultures traitées et témoins, afin de mesurer le retard du cycle cellulaire en cas de recours à la méthode de blocage de la cytokinèse. En l'absence de cytoB, il convient de mesurer le doublement relatif de la population (RPD) ou l'augmentation relative du nombre de cellules (RICC) (voir annexe 2).

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

Critères d'acceptabilité

56. 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 50).
- Les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 50) induisent des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produisent une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants.
- Les critères de prolifération cellulaire dans le témoin de solvant sont remplis (voir paragraphes 25-27).
- Toutes les conditions expérimentales ont été testées, à moins que l'une d'entre elles ait abouti à des résultats positifs (voir paragraphes 36-40).
- Un nombre adéquat de cellules et de concentrations sont analysables (voir paragraphes 28 et 44-46).
- Les critères de sélection de la concentration maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 24-31.

Évaluation et interprétation des résultats

57. 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 paragraphes 36-39) :

- a) au moins une des concentrations d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (89),
- b) un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose dans au moins une condition expérimentale (voir paragraphe 28),

- 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 52).

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des cassures chromosomiques et/ou un gain ou une perte chromosomique dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (90) (91) (92).

58. 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 paragraphes 36-39) :

- 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 52).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des cassures chromosomiques et/ou un gain ou une perte chromosomique dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (90) (91) (92).

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

60. Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, tel que décrit ci-dessus, ou en vue d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'expert 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].

61. Dans de rares cas, même après des études complémentaires, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure à un résultat positif ou négatif, et le résultat sera déclaré équivoque.

62. Lorsque des produits chimiques d'essai induisent la formation de micronoyaux lors de l'essai MNvit, celle-ci est due soit à une cassure chromosomique, soit à une perte chromosomique, soit aux deux événements combinés. Il est possible de procéder à d'autres analyses à l'aide d'anticorps anti-kinétochores, de sondes centromériques *in situ* ou d'autres méthodes afin de déterminer si le mécanisme d'induction de micronoyaux est le résultat d'une activité clastogène et/ou aneugène.

Rapport d'essai

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

Produit chimique d'essai :

- source, numéro de lot et date limite d'utilisation, si c'est disponible ;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue ;
- réactivité du produit chimique d'essai avec le solvant/véhicule ou le milieu de culture cellulaire ;

- 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 ;
- pourcentage de solvant dans le milieu de culture final.

Cellules :

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

Conditions de l'essai :

- identité de l'éventuel agent de blocage de la cytokinèse utilisé (cytoB, par exemple), sa concentration et la durée d'exposition des cellules ;
- 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 CO₂ le cas échéant, degré d'humidité ;
- concentration (et/ou volume) de solvant et de produit chimique d'essai ajoutée au milieu de culture ;
- température et 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 (activité enzymatique, stérilité, capacité métabolique, par exemple) ;
- substances chimiques des témoins positifs et négatifs, concentrations finales, conditions et durée des périodes de traitement et de récupération ;
- méthodes de préparation des lames et technique de coloration utilisées ;
- critères d'analyse des cellules micronucléées (choix des cellules analysables et identification du micronoyau) ;
- nombre de cellules 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 ;
- méthode(s) d'analyse statistique utilisée(s) ;
- méthodes, telles que le recours aux anticorps anti-kinétochores ou aux sondes centromériques, utilisées pour déterminer si les micronoyaux possèdent des chromosomes entiers ou fragmentés, le cas échéant ;
- méthodes utilisées pour déterminer le pH, l'osmolalité et la précipitation.

Résultats :

- définition des cellules acceptables pour l'analyse ;
- en l'absence de cytoB, nombre de cellules exposées et nombre de cellules récoltées pour chaque culture en cas de lignées cellulaires ;
- mesures de la cytotoxicité, par exemple CBPI ou RI dans le cas de la méthode de blocage de la cytokinèse ; RICC ou RPD lorsque la méthode de blocage de la cytokinèse n'est pas utilisée ; autres observations le cas échéant (degré de confluence cellulaire, apoptose, nécrose, numération des cellules en métaphase, fréquence des cellules binucléées) ;
- signes de précipitation et moment de la détermination ;
- données sur le pH et l'osmolalité du milieu de traitement, si elles ont été déterminées ;
- répartition des cellules mono-, bi- et multinucléées en cas d'utilisation d'une méthode de blocage de la cytokinèse ;
- nombre de cellules micronucléées, donné séparément pour chaque culture traitée et culture témoin, en précisant si elles proviennent de cellules binucléées ou mononucléées, s'il y a lieu ;
- relation concentration-réponse, si possible ;
- données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs (concentrations et solvants) concomitants ;
- données relatives aux témoins négatifs (avec 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. En préparation.
- (2) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 1-4.
- (3) Parry, J.M., A. Sors (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.
- (4) Fenech, M., A.A. Morley (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios*, Vol. 43/172-173, pp. 233-246.
- (5) Kirsch-Volders, M. et al. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.
- (6) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, Vol. 2/5, pp. 1084-1104.
- (7) Fenech, M., A.A. Morley (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Research*, Vol. 161/2, pp. 193-198.
- (8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 13/1, pp. 34-43.
- (9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Research*, Vol. 234/5, pp. 9-20.
- (10) Miller, B.M. et al. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.
- (11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, Vol. 8/4, pp. 329-334.
- (12) Migliore, L. et al. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Research*, Vol. 319/3, pp. 205-213.
- (13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 519-525.
- (14) Eastmond, D.A., D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene

- metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Research*, Vol. 322/1, pp. 9-20.
- (15) Marshall, R.R. et al. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Research*, Vol. 372/2, pp. 233-245.
- (16) Zijno, P. et al. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 372/2, 211-219.
- (17) Kirsch-Volders et al. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group, *Mutation Research*, Vol. 540/2, pp. 153-163.
- (18) OECD (1997), *Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
<http://dx.doi.org/10.1787/9789264071261-en>.
- (19) Lorge, E. et al. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 13-36.
- (20) Clare, G. et al. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 37-60.
- (21) Aardema, M.J. et al. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 61-87.
- (22) Wakata, A. et al. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 88-124.
- (23) Oliver, J. et al. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 125-152.
- (24) Albertini, S. et al. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 187-208.
- (25) Miller, B. et al. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 45-59.
- (26) Miller, B. et al. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research*, Vol. 410, pp. 81-116.
- (27) Kalweit, S. et al. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Research*, Vol. 439/2, pp. 183-190.

- (28) Kersten, B. et al. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Research*, Vol. 445/1, pp. 55-71.
- (29) von der Hude, W. et al. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Research*, Vol. 468/2, pp. 137-163.
- (30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 123-134.
- (31) Matsushima, T. et al. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, Vol. 14/6, pp. 569-580.
- (32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 607/1, pp. 1-152.
- (33) Kirkland, D. (2010), Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial, *Mutation Research*, Vol. 702/2, pp. 139-147.
- (34) Hashimoto K. et al. (2011), Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 59/1, pp. 28-36.
- (35) Honma, M., M. Hayashi (2011), Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.
- (36) Zhang, L.S. et al. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Research Letters*, Vol. 347/3-4, pp. 105-115.
- (37) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing, ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006, Available at: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (38) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Available at: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>.
- (39) Corvi, R. et al. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, Vol 23/4, pp. 271-283.
- (40) ILSI paper (draft), Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research*.

- (41) Scott, D. et al. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research*, Vol. 257/2, pp. 147-205.
- (42) Morita, T. et al. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Research*, Vol. 268/2, pp. 297-305.
- (43) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.
- (44) 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*, Vol. 634/1-2, pp. 177-183.
- (45) Nessler, F. et al. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutation*, Vol. 49, pp. 439-452.
- (46) Fenech, M., A.A. Morley (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 147/1-2, pp. 29-36.
- (47) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Research*, Vol. 392, pp. 11-18.
- (48) Payne, C.M. et al. (2010), Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis, *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.
- (49) Bazin, E. et al. (2010), Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin, Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.
- (50) Le Hegarat, L. et al. (2010), Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays, *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.
- (51) Josse, R. et al. (2012), An adaptation of the human HepaRG cells to the in vitro micronucleus assay, *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.
- (52) Ehrlich, V. et al. (2002), Fumonisin B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, Vol. 17/3, pp. 257-260.
- (53) Knasmüller, S. et al. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicology*, Vol. 198/1-3, pp. 315-328.
- (54) Gibson, D.P. et al. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Research*, Vol. 392/1-2, pp. 61-70.

- (55) Bonassi, S. et al. (2001), HUMAN MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 37/1, pp. 31-45.
- (56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.
- (57) 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.
- (58) Elliott, B.M. et al. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays, *Mutagenesis*, Vol. 7, pp. 175-177.
- (59) 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.
- (60) 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, pp. 51-59.
- (61) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: [<http://www.pops.int/>]
- (62) 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.
- (63) 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.
- (64) 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 Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.
- (65) 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.
- (66) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Research*, Vol. 285/1, pp. 35-44.
- (67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an

- examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Research*, Vol. 521/1-2, pp. 103-112.
- (68) Kirsch-Volders, M. et al. (2004), Corrigendum to "Report from the *in vitro* micronucleus assay working group", *Mutation Research*, 564, 97-100.
- (69) 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*, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.
- (70) Surralles, J. et al. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Research*, Vol. 341/3, pp. 169-184.
- (71) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.
- (72) Pfuhrer, S. et al. (2011), In vitro genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.
- (73) 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 sur demande.
- (74) 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*, Vol. 741, pp. 32-56.
- (75) 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.
- (76) 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>.
- (77) Sobol, Z. et al. (2012), Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells, *Mutation Research*, Vol.746/1, pp. 29-34.
- (78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (80) Bryce, S.M. et al. (2011), Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280-286.

- (81) Nicolette, J. et al. (2011), In vitro micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355–362.
- (82) Shi, J., R. Bezabhe, A. Szkudlinska (2010), Further evaluation of a flow cytometric in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies, *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.
- (83) 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.
- (84) Fenech, M. et al. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Research*, Vol. 534/1-2, pp. 65-75.
- (85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998), Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay, *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.
- (86) Kirsch-Volders, M. et al. (2011), The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance, *Archives of Toxicology*, Vol. 85/8, pp. 873-99.
- (87) Hayashi, M. et al. (2010), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.
- (88) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003), “In vitro micronucleus test’, in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed., Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.
- (90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
- (91) 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.
- (92) 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.
- (93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

ANNEXE 1

DÉFINITIONS

Aneugène : substance ou processus qui, via des interactions avec les composants de la cellule mitotique ou méiotique lors de la division cellulaire, provoque la formation de cellules ou d'organismes aneuploïdes.

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) : méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'annexe 2).

Cellules en interphase : cellules qui ne sont pas en phase de mitose.

Centromère : région de l'ADN d'un chromosome où les deux chromatides sont reliées entre elles et sur laquelle les deux kinétochores sont fixés côte à côte.

Clastogène : substance ou événement 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.

Cytokinèse : processus de division cellulaire survenant immédiatement après la mitose pour former deux cellules-filles, contenant chacune un noyau unique.

Cytostase : inhibition de la croissance cellulaire (voir formule à l'annexe 2).

Cytotoxicité : pour les essais visés par la présente Ligne directrice effectués en présence de cytochalasine B, la cytotoxicité correspond à une baisse de l'indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (CBPI) ou de l'indice de réplication (RI) des cellules traitées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe 26 et annexe 2). Pour les essais visés par la présente Ligne directrice effectués en l'absence de cytochalasine B, 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 27 et annexe 2).

Doublement relatif de la population (Relative Population Doubling, RPD) : méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'annexe 2).

Fraction S9 de foie : surnageant d'homogénat de foie centrifugé à 9 000g (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 de 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 de prolifération (*Proliferation Index, PI*): méthode de mesure de la cytotoxicité lorsque la cytoB n'est pas utilisée (voir formule à l'annexe 2).

Indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (*Cytokinesis-Block Proliferation Index, CBPI*): proportion de cellules issues de la deuxième division dans la population traitée par rapport au témoin non traité (voir formule à l'annexe 2).

Indice de réplication (*Replication Index, RI*): rapport entre le nombre de cycles de division cellulaire achevés dans une culture traitée et ce même nombre dans le témoin non traité, au cours de la période d'exposition et la récupération (voir formule à l'annexe 2).

Indice mitotique: nombre de cellules en métaphase divisé par le nombre total de cellules dans une population ; une indication de la vitesse de prolifération cellulaire dans cette population.

Kinétochore: assemblage de protéines situé au niveau du centromère d'un chromosome, auquel sont associées les fibres fusoriales lors de la division cellulaire, permettant le mouvement ordonné des chromosomes-fils vers les pôles des cellules-filles.

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

Micronoyau: petit noyau, venant s'ajouter au noyau principal de la cellule et séparé de celui-ci, formé lors de la télophase de la mitose ou de la méiose à partir de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes retardataires.

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).

Non-disjonction: non-séparation d'une paire de chromatides, qui ne parviennent donc pas à migrer correctement lors de la division cellulaire, ce qui entraîne la présence d'un nombre anormal de chromosomes dans les cellules-filles.

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 fonctionnelle p53, 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.

Témoin non traité: 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

1. ***En cas d'utilisation de la cytoB***, l'évaluation de la cytotoxicité se fonde sur l'**indice de prolifération des cellules dont la division cytoplasmique a été bloquée (CBPI)** ou sur l'**indice de réplication (RI)** (17) (69). Le CBPI indique le nombre moyen de noyaux par cellule, et peut servir au calcul de la prolifération cellulaire. Le RI indique le nombre relatif de cycles cellulaires par cellule effectués au cours de la période d'exposition à la cytoB dans les cultures traitées par rapport aux cultures témoins, et peut servir au calcul du pourcentage de cytotostase :

$$\% \text{ cytotostase} = 100 - 100 \{ (\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1) \}$$

Avec :

T = culture traitée avec le produit chimique d'essai

C = culture témoin

Où :

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{nb de cellules mononucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules binucléées}) + (3 \times \text{nb de cellules multinucléées}))}{(\text{nombre total de cellules})}$$

Ainsi, un CBPI égal à 1 (toutes les cellules sont mononucléées) équivaut à une cytotostase de 100 %.

$$\text{Cytostase} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{nb de cellules binucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules multinucléées})) \div (\text{nombre total de cellules})_T}{((\text{nb de cellules binucléées}) + (2 \times \text{nb de cellules multinucléées})) \div (\text{nombre total de cellules})_C} \times 100$$

T = cultures traitées

C = cultures témoins

2. Ainsi, un RI de 53 % signifie que, par rapport au nombre de cellules ayant effectué une division cellulaire pour former des cellules binucléées et multinucléées dans la culture témoin, 53 % seulement de ces cellules ont effectué une division dans la culture traitée, soit une cytotostase de 47 %.

3. ***En l'absence d'utilisation de cytoB***, l'évaluation de la cytotoxicité sur la base de l'**augmentation relative du nombre de cellules (RICC)** ou du **doublément relatif de la population (RPD)** est recommandée (69), ces deux mesures tenant 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 = $[\log (\text{nombre de cellules post-application} \div \text{nombre de cellules initial})] \div \log 2$

4. Par exemple, une RICC ou un RPD de 53 % indique une cytotoxicité/cytostase de 47 %.

5. En utilisant l'**indice de prolifération (PI)**, on peut évaluer la cytotoxicité via le comptage du nombre de clones composés de 1 cellule (c11), 2 cellules (c12), 3 à 4 cellules (c14) et 5 à 8 cellules (c18)

$$\text{PI} = \frac{((1 \times c11) + (2 \times c12) + (3 \times c14) + (4 \times c18))}{(c11 + c12 + c14 + c18)}$$

6. Le PI est également un paramètre fiable et utile de cytotoxicité pour les lignées cellulaires cultivées *in vitro* en l'absence de cytoB (25) (26) (27) (28) et peut être considéré comme un autre paramètre utile.

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 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.

En cas d'utilisation de systèmes d'analyse automatique tels que la cytométrie en flux, la cytométrie à balayage laser ou l'analyse d'images, le nombre de noyaux peut remplacer le nombre de cellules dans la formule.

Dans les cultures témoins négatives, le doublement de la population ou l'indice de réplication doivent être compatibles avec l'obligation de prélever des cellules à l'issue d'une période équivalente à environ 1.5 à 2 fois la durée normale du cycle cellulaire après le début du traitement.