

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

**TEST DES COMÈTES *IN VIVO* EN CONDITIONS ALCALINES SUR CELLULES DE
MAMMIFÈRES**

INTRODUCTION

1. Le test des comètes *in vivo* en conditions alcalines (*single cell gel electrophoresis*, technique d'électrophorèse de cellules isolées en gel d'agarose), appelé simplement ci-après test des comètes, est utilisé pour la détection des cassures de brins d'ADN dans des cellules ou noyaux isolés à partir de divers tissus d'animaux, habituellement des rongeurs, qui ont été exposés à un/des produit(s) potentiellement génotoxique(s). Le test des comètes a été examiné et des recommandations ont été publiées par divers groupes d'experts (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). 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 pour les essais de génotoxicité (11), 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 des comètes a pour objet d'identifier les substances causant des dommages à l'ADN. En conditions alcalines (pH > 13), le test des comètes peut détecter les cassures simple- et double-brin résultant, par exemple, d'interactions directes avec l'ADN, de sites alcali-labiles ou de cassures transitoires liées à des mécanismes de réparation par excision. Ces cassures peuvent être réparées, leur effet étant alors non persistant, elles peuvent être létales pour la cellule, ou elles peuvent se fixer sous forme de mutation stable se traduisant par une altération viable permanente. Elles peuvent aussi entraîner des dommages chromosomiques du type de ceux qui sont associés à de nombreuses maladies humaines comme le cancer.

3. Des études de validation formelle du test des comètes *in vivo* sur les rongeurs ont été coordonnées en 2006-2012 par le Centre japonais pour la validation des méthodes alternatives (JaCVAM), en collaboration avec le Centre européen pour la validation des méthodes alternatives (ECVAM), le Comité de coordination inter-agences pour la validation des méthodes alternatives (ICCVAM) et le Centre inter-agences pour l'évaluation des méthodes toxicologiques alternatives du NTP (NICEATM) (12). La présente Ligne directrice indique les applications recommandées et les limites du test des comètes ; elle est fondée sur le protocole final (12) utilisé dans les essais de validation, et sur d'autres données pertinentes, publiées ou non (données privées des laboratoires).

4. Les termes-clés sont définis à l'annexe 1. On notera qu'un grand nombre de supports différents peuvent être utilisés pour ce test (lames de microscope, spots de gel, plaques 96 puits, etc.). Pour des raisons pratiques, le terme de « lame » désigne dans ce qui suit l'ensemble de ces supports.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

5. Le test des comètes est une méthode utilisée pour mesurer les cassures de brins d'ADN dans les cellules eucaryotes. Des cellules/noyaux isolés inclus dans un gel d'agarose déposé sur une lame sont lysés sous l'action d'un détergent et de sels à forte concentration. Cette étape de lyse digère les membranes cellulaires et nucléaires et libère des boucles d'ADN enroulé, généralement appelées nucléoïdes ou fragments d'ADN. L'électrophorèse à pH élevé produit des structures ressemblant à des comètes qui, si l'on utilise les colorants fluorescents appropriés, peuvent être observées par microscopie à fluorescence ; les fragments d'ADN migrent de la « tête » vers la « queue » de la comète, selon leur taille, et l'intensité de fluorescence de la queue par rapport à l'intensité totale (tête plus queue) reflète l'ampleur des cassures de l'ADN (13) (14) (15).

6. Le test des comètes *in vivo* en conditions alcalines se prête particulièrement bien à l'évaluation du risque génotoxique, dans la mesure où les réponses au test sont dépendantes de l'ADME (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) *in vivo*, ainsi que des processus de réparation de l'ADN. Ces paramètres peuvent varier selon les espèces, les tissus et les types de dommages subis par l'ADN.

7. Pour satisfaire aux exigences en matière de bien-être animal, en particulier en ce qui concerne la réduction de l'utilisation d'animaux (règle des 3Rs – *reduction, refinement, replacement*, à savoir réduction du nombre d'animaux, réduction des souffrances des animaux, remplacement de l'expérimentation animale par d'autres méthodes), ce test peut aussi être intégré à d'autres études toxicologiques, telles que les études de toxicité à doses répétées (10) (16) (17), ou le paramètre étudié peut être combiné à d'autres paramètres de génotoxicité, dans le cas par exemple du test des micronoyaux sur érythrocytes de mammifères *in vivo* (18) (19) (20). Le test des comètes est le plus souvent réalisé sur des rongeurs, bien qu'il ait été appliqué à d'autres espèces, mammifères ou non. L'utilisation d'espèces autres que des rongeurs devra être justifiée au cas par cas du point de vue scientifique et éthique, et il est fortement recommandé de ne réaliser le test des comètes sur des espèces autres que des rongeurs que dans le cadre d'une autre étude de toxicité, et non en tant qu'essai indépendant.

8. La sélection de la voie d'exposition et du/des tissu(s) à étudier sera fondée sur l'ensemble des connaissances existantes/disponibles concernant les substances chimiques testées, par exemple la voie d'exposition humaine prévue/anticipée, le métabolisme et la distribution, le potentiel d'effets au site de contact, les alertes structurelles, d'autres données de génotoxicité ou de toxicité, ainsi que l'objectif de l'étude. Le potentiel génotoxique des substances chimiques testées peut ainsi être étudié, s'il y a lieu, sur le(s) tissu(s) cible(s) d'un effet cancérigène et/ou d'autres effets toxiques. Le test est également considéré comme utile pour explorer plus avant un effet génotoxique détecté dans un système *in vitro*. Il est opportun de réaliser un test des comètes *in vivo* sur un tissu donné si l'on peut raisonnablement s'attendre à ce que ce tissu soit exposé de façon adéquate.

9. Les études de validation les plus complètes dont le test ait fait l'objet ont porté sur les tissus somatiques de rats mâles, dans le cadre d'études interlaboratoires internationales du JaCVAM (12) ou dans Rothfuss *et al.* 2010 (10). Le foie et l'estomac ont été utilisés dans les études de validation internationales du JaCVAM. Le foie, parce que c'est l'organe le plus actif dans le métabolisme des substances chimiques, et que c'est fréquemment un organe cible pour la cancérigénicité. L'estomac, parce que c'est généralement le premier site de contact avec les substances chimiques en cas d'exposition orale, bien que d'autres régions du tractus gastro-intestinal, comme le duodénum et le jéjunum, puissent aussi être envisagées comme sites de contact et soient peut-être plus pertinentes pour l'homme que l'estomac glandulaire des rongeurs. On veillera à ce que ces tissus ne soient pas exposés à des concentrations trop élevées de la

substance testée (21). La technique est applicable en principe à tout tissu dont il est possible de dériver des suspensions de cellules/noyaux isolés analysables. Les données privées de nombreux laboratoires démontrent qu'elle peut être appliquée avec succès à un grand nombre de tissus différents, et de nombreuses publications montrent son applicabilité à des organes ou tissus autres que le foie et l'estomac, comme le jéjunum (22), les reins (23) (24), la peau (25) (26), ou des cellules provenant de la vessie (27) (28) ou de lavages pulmonaires ou bronchoalvéolaires (dans le cas d'études portant sur des substances inhalées) (29) (30) ; des tests ont également été réalisés sur plusieurs organes simultanément (31) (32).

10. S'il peut être intéressant d'étudier les effets génotoxiques sur des cellules germinales, on notera que le test des comètes standard en conditions alcalines tel qu'il est décrit dans la présente Ligne directrice n'est pas considéré comme approprié pour mesurer les cassures de brins d'ADN dans des cellules germinales matures. Étant donné que, s'agissant des dommages à l'ADN, des niveaux de fond élevés et variables ont été rapportés dans une revue de la littérature portant sur l'utilisation du test des comètes dans les études de génotoxicité sur les cellules germinales (33), des modifications du protocole et des études améliorées de validation et de standardisation sont jugées nécessaires avant que le test des comètes sur cellules germinales matures (cellules spermatiques, par exemple) puisse être inclus dans la présente Ligne directrice. De plus, le régime d'exposition recommandé dans cette Ligne directrice n'est pas optimal et seuls des temps d'exposition ou d'échantillonnage plus longs permettraient une analyse valable des cassures de brins d'ADN dans le sperme mature. Les effets génotoxiques mesurés par le test des comètes sur des cellules testiculaires à différents stades de différenciation ont été décrits dans la littérature (34) (35). Il convient cependant de noter que les gonades contiennent un mélange de cellules somatiques et de cellules germinales. Pour cette raison, des résultats positifs sur l'ensemble des gonades (testicules) ne témoignent pas nécessairement de dommages touchant les cellules germinales ; ils indiquent néanmoins que la/les substance(s) chimique(s) testée(s) et/ou ses/leurs métabolites et ont atteint les gonades.

11. Les pontages ne peuvent pas être détectés de façon fiable dans les conditions expérimentales standard du test des comètes. Dans certaines conditions expérimentales modifiées, des pontages ADN-ADN et ADN-protéine, ainsi que d'autres modifications des bases telles que des bases oxydées pourraient être détectées (23) (36) (37) (38) (39). Des études complémentaires seraient nécessaires pour caractériser de façon adéquate les modifications à apporter au protocole. La détection des agents responsables de pontages n'est donc pas l'objectif premier du test décrit ici. Celui-ci n'est pas adapté, même en cas de modifications, pour la détection des substances aneugènes.

12. Dans l'état actuel des connaissances, le test des comètes *in vivo* présente une série d'autres limites (voir l'annexe 3). Il faut s'attendre à ce que cette Ligne directrice soit révisée à l'avenir et modifiée s'il y a lieu à la lumière des acquis de l'expérience.

13. 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 LA MÉTHODE

14. Les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine. Une description précise de l'administration des doses et de l'échantillonnage est donnée aux paragraphes 36-40. Au(x) moment(s) retenu(s) pour l'échantillonnage, les tissus à étudier sont disséqués et des suspensions de cellules/noyaux isolés sont préparées (une perfusion *in situ* peut être pratiquée si cela est jugé utile, par exemple, pour le foie) et incluses dans un gel d'agarose pour être fixées sur des lames. Les cellules/noyaux sont traités avec un tampon de lyse pour éliminer la membrane cellulaire et/ou nucléaire, et exposés à une

base forte (de $\text{pH} \geq 13$, par exemple) pour permettre le déroulement de l'ADN et la libération des boucles et fragments d'ADN déroulés. L'ADN nucléaire dans l'agar est alors soumis à l'électrophorèse. Les molécules d'ADN normales, non fragmentées, restent dans la position où l'ADN nucléaire se trouvait dans l'agar, tandis que tous les fragments d'ADN et boucles d'ADN déroulées migrent vers l'anode. Après l'électrophorèse, l'ADN est visualisé au moyen d'un colorant fluorescent approprié. Les préparations doivent être analysées au microscope et au moyen de systèmes d'analyse d'image automatiques ou semi-automatiques. L'ampleur de la migration de l'ADN au cours de l'électrophorèse et la distance de migration reflètent la quantité et la taille des fragments d'ADN. Différents paramètres peuvent être évalués dans le test des comètes. La proportion d'ADN présent dans la queue, ou intensité de la queue (*% tail DNA*, ou *% tail intensity*) a été recommandée pour évaluer les dommages à l'ADN (12) (40) (41) (42). Après analyse d'un nombre suffisant de noyaux, les résultats du test sont interprétés à l'aide de méthodes d'analyse appropriées.

15. On notera que les modifications apportées à des aspects de la méthodologie tels que la préparation des échantillons, les conditions d'électrophorèse, les paramètres d'analyse visuelle (intensité du colorant, intensité lumineuse de l'ampoule du microscope, par exemple, ou mise en place de filtres sur le microscope et paramètres dynamiques de la caméra) et les conditions ambiantes (éclairage de fond, par exemple) peuvent affecter la migration de l'ADN (43) (44) (45) (46).

VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

16. Chaque laboratoire doit établir ses compétences pour la réalisation du test des comètes, en démontrant son aptitude à obtenir des suspensions de cellules ou de noyaux isolés d'une qualité suffisante pour chaque tissu cible de chaque espèce étudiée. La qualité des préparations sera évaluée avant tout d'après le pourcentage d'ADN présent dans la queue des comètes chez les animaux traités par le véhicule, pour lesquels les valeurs doivent se situer dans une plage basse reproductible. Les données actuelles suggèrent que le pourcentage moyen d'ADN de queue du groupe (d'après la moyenne des médianes – voir le paragraphe 57 pour ces termes) dans le foie de rat devrait, de préférence, ne pas dépasser 6 %, ce qui serait cohérent avec les valeurs des essais de validation du JaCVAM (12) et d'autres données publiées ou privées. On ne dispose pas de données suffisantes à l'heure actuelle pour formuler des recommandations sur les plages optimales ou acceptables concernant d'autres tissus, ce qui n'exclut pas de recourir à d'autres tissus si cela se justifie. Le rapport d'essai devra rendre compte de façon appropriée de la conduite du test des comètes sur ces tissus en faisant référence à la littérature publiée ou à des données privées. Premièrement, un faible pourcentage d'ADN de queue chez les témoins est souhaitable afin de disposer d'une plage dynamique suffisante pour détecter un effet positif. Deuxièmement, chaque laboratoire doit être en mesure de reproduire les réponses attendues pour des mutagènes directs et des promutagènes, pour différents modes d'action, selon les exemples proposés au tableau 1 (paragraphe 29).

17. Des substances positives peuvent être sélectionnées, par exemple à partir des essais de validation du JaCVAM (12) ou d'autres données publiées (voir paragraphe 9), s'il y a lieu, moyennant une justification et en établissant la preuve de réponses clairement positives dans les tissus d'intérêt. La capacité à détecter les effets faibles de mutagènes connus tels que l'EMS à faibles doses doit également être démontrée, en établissant par exemple des relations dose-réponse avec des nombres de doses et des écarts entre doses appropriés. Les efforts doivent porter dans un premier temps sur l'établissement des compétences pour les tissus les plus couramment utilisés, le foie de rongeurs par exemple, pour lesquels il est possible d'effectuer une comparaison avec les données existantes et les résultats attendus (12). Les données provenant d'autres tissus (estomac/duodénum/jéjunum, sang, etc.) pourraient être collectées simultanément. Le laboratoire devra faire la preuve de sa compétence pour chaque tissu de chaque espèce qu'il prévoit d'étudier, et démontrer qu'une réponse positive acceptable peut être obtenue avec un

mutagène connu (l'EMS, par exemple) sur ces tissus.

18. Il convient de collecter les données sur les témoins négatifs/traités par le véhicule afin de démontrer la reproductibilité des réponses négatives et d'établir que les aspects techniques de l'essai ont été correctement maîtrisés, ou de suggérer la nécessité d'établir de nouvelles plages de données des témoins historiques (voir paragraphe 22).

19. On notera que, si plusieurs tissus peuvent être collectés lors de la nécropsie et traités en vue de l'analyse des comètes, le laboratoire doit être compétent pour recueillir différents tissus sur un même animal, assurant ainsi qu'aucune lésion potentielle de l'ADN ne sera négligée et que l'analyse des comètes ne sera pas compromise. L'intervalle de temps entre le sacrifice des animaux et le prélèvement des tissus en vue de leur traitement peut être critique (voir paragraphe 44).

20. Le bien-être animal doit être pris en compte lors du développement des compétences pour ce test, et des tissus provenant d'animaux utilisés pour d'autres tests peuvent être utilisés pour se former aux différents aspects du test. De plus, il peut ne pas être nécessaire de conduire une étude complète lors des étapes d'établissement d'une nouvelle méthode d'essai dans un laboratoire, et il est possible de réduire le nombre d'animaux ou le nombre de concentrations étudiées lors de l'acquisition des gestes nécessaires.

Données des témoins historiques

21. Dans le cadre de la vérification des compétences, le laboratoire mettra en place une base de données historiques établissant les plages et distributions des témoins positifs et négatifs pour les tissus et espèces étudiés. On trouve dans la littérature (47) des 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). Différents tissus et différentes espèces, ainsi que différents véhicules et voies d'administration, peuvent donner des pourcentages d'ADN dans la queue différents pour les témoins négatifs. Il importe donc d'établir les plages des témoins négatifs pour chaque tissu et chaque espèce. 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 et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie. Le choix des substances chimiques utilisées comme témoins positifs, des gammes de doses et des conditions expérimentales (conditions de l'électrophorèse, par exemple) peut devoir être optimisé pour la détection d'effets faibles (voir paragraphe 17).

22. 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.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Choix des espèces animales

23. On choisit habituellement des souches communément utilisées en laboratoire de jeunes rongeurs adultes sains (âgés de 6 à 10 semaines au début du traitement, bien que des animaux un peu plus âgés soient également acceptables). Le choix de l'espèce de rongeur doit être fondé sur (i) les espèces utilisées dans d'autres études de toxicité (pour qu'il soit possible de corréler les données et pour permettre des

études intégrées), (ii) les espèces qui ont développé des tumeurs dans une étude de cancérogénicité (lors d'investigations portant sur le mécanisme de cancérogenèse), ou (iii) les espèces dont le métabolisme est le plus proche de celui de l'homme, si elles sont connues. Les rats sont couramment utilisés dans cet essai. Il est toutefois possible de recourir à d'autres espèces si cela est justifié d'un point de vue éthique et scientifique.

Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux

24. Pour les rongeurs, la température de l'animalerie est idéalement de 22 °C (\pm 3 °C). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 30 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les rongeurs sont mis en cage par petits groupes comprenant généralement un maximum de cinq animaux du même sexe si aucun comportement agressif n'est à craindre. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié du point de vue scientifique. Dans la mesure du possible, le fond des cages doit être plein, les fonds grillagés pouvant provoquer de graves blessures (49). Un enrichissement environnemental approprié doit être fourni.

Préparation des animaux

25. Les animaux sont répartis de manière aléatoire entre les groupes traités et les groupes témoins. Ils sont identifiés individuellement et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le commencement de l'étude, afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. La méthode d'identification individuelle des animaux doit être la moins invasive possible. Les méthodes appropriées sont notamment le baguage, l'étiquetage, la pose d'une puce électronique et l'identification biométrique. L'utilisation d'agrafes au niveau de la patte ou de l'oreille n'est pas scientifiquement justifiée pour ces essais. Les cages doivent être placées de façon à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas excéder \pm 20 %.

Préparation des doses

26. Lorsque les produits chimiques testés sont solides, ils sont dissous ou mis en suspension dans des véhicules appropriés, ou incorporés aux aliments ou à l'eau de boisson avant d'être administrés aux animaux. Les produits chimiques liquides peuvent être administrés directement ou dilués avant d'être administrés. En cas d'exposition par inhalation, les produits chimiques testés peuvent être administrés sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (50) (51).

27. On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

Conditions de l'essai**Véhicule**

28. Le véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux volumes administrés, ni être suspecté de réagir avec les substances chimiques d'essai. Le recours à des véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité eu égard aux animaux d'essai, à la voie d'administration et à l'effet mesuré. Il est recommandé d'envisager en premier lieu l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible. On notera que certains véhicules (en particulier les véhicules visqueux) peuvent induire une inflammation et augmenter le niveau de fond des cassures de brins d'ADN au site de contact, en particulier en cas d'administration répétée.

Témoins**Témoins positifs**

29. A l'heure actuelle, chaque essai doit normalement inclure un groupe d'au moins trois animaux analysables du même sexe, ou de chaque sexe si les deux sont utilisés (voir paragraphe 32), traités avec un produit chimique utilisé comme témoin positif. Il se peut qu'à l'avenir, le laboratoire puisse démontrer que ses compétences permettent de réduire le nombre de témoins positifs. Si plusieurs moments d'échantillonnage sont prévus (par exemple dans le cas d'un protocole comportant une seule administration), il n'y a lieu d'inclure des témoins positifs que pour l'un des moments d'échantillonnage, mais il importe de veiller à une répartition équilibrée (voir paragraphe 48). Il n'est pas nécessaire d'administrer les substances chimiques utilisées simultanément comme témoins positifs par la même voie que le produit chimique testé, mais il importe d'utiliser la même voie pour mesurer les effets au site de contact. Il doit être établi que les substances utilisées comme témoins positifs induisent des cassures de brins d'ADN dans tous les tissus d'intérêt pour le produit chimique testé, et l'EMS sera sans doute le témoin positif de choix dans la mesure où il a provoqué des cassures de brins d'ADN dans tous les tissus sur lesquels il a été étudié. Les doses des substances chimiques utilisées comme témoins positifs sont sélectionnées de manière à produire des effets modérés permettant une évaluation éclairée des performances et de la sensibilité du test ; elles peuvent être fondées sur les courbes dose-réponse établies par le laboratoire dans le cadre de la démonstration de ses compétences. Le pourcentage d'ADN de queue chez les témoins positifs simultanés doit être en cohérence avec la plage préétablie par le laboratoire pour chaque tissu et moment d'échantillonnage pour l'espèce considérée (voir paragraphe 16). Des exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs et de certains de leurs tissus cibles (chez les rongeurs) figurent au tableau 1. Des substances chimiques autres que celles du tableau 1 peuvent être sélectionnées si cela est scientifiquement justifié.

Tableau 1: Exemples de substances utilisées comme témoins positifs et de certains de leurs tissus cibles

Produit chimique et n° CAS
Éthyl méthanesulfonate (n° CAS 62-50-0), tout tissu
Éthyl nitrosourée (n° CAS 759-73-9), foie et estomac, duodénum ou jéjunum
Méthyl méthanesulfonate (n° CAS 66-27-3), foie, estomac, duodénum ou jéjunum, cellules obtenues par lavage pulmonaire et bronchoalvéolaire, reins, vessie, poumons, testicules et moelle osseuse/sang
<i>N</i> -Méthyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (n° CAS 70-25-7), estomac, duodénum ou jéjunum
1,2-Diméthylhydrazine 2HCl (n° CAS 306-37-6), foie et intestin
<i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -nitrosourée (n° CAS 684-93-5), foie, moelle osseuse, sang, reins, estomac, jéjunum et cerveau.

Témoins négatifs

30. Un groupe d'animaux témoins négatifs auxquels est administré le véhicule seul, et qui sont traités par ailleurs de la même façon que les groupes exposés, doit être inclus dans chaque essai pour chaque moment d'échantillonnage et chaque tissu. Le pourcentage d'ADN de queue chez les animaux témoins négatifs doit se trouver dans la plage de référence préétablie par le laboratoire pour chaque tissu et chaque moment d'échantillonnage pour cette espèce (voir paragraphe 16). En l'absence de données historiques ou publiées sur les témoins montrant que le véhicule choisi, le nombre d'administrations ou la voie d'administration n'induisent aucun effet délétère ou génotoxique, des études préliminaires seront réalisées avant d'entreprendre l'étude complète, afin d'établir l'acceptabilité des témoins recevant le véhicule.

MODE OPÉRATOIRE**Nombre et sexe des animaux**

31. Bien qu'il existe peu de données sur des animaux femelles permettant des comparaisons entre sexes dans le cas du test des comètes, les réponses aux autres tests de génotoxicité *in vivo* sont généralement similaires chez les animaux mâles et femelles, et la plupart des études pourrait donc être réalisée sur l'un ou l'autre des deux sexes. Des données démontrant des différences significatives entre les mâles et les femelles (par exemple sur le plan de la toxicité systémique, du métabolisme, de la biodisponibilité, etc comprenant également des données provenant par exemple d'études de détermination des doses) encouragent l'utilisation des deux sexes. Il peut donc être plus approprié dans ce cas de mener une étude sur les deux sexes, par exemple dans le cadre d'une étude de toxicité à doses répétées. Il pourrait être judicieux de recourir à un plan factoriel en cas d'utilisation des deux sexes. Des précisions sur cette méthode d'analyse des données sont fournies à l'annexe 2.

32. La taille des groupes au début de l'étude (et lors de l'établissement des compétences) doit permettre de disposer d'au moins cinq animaux analysables du même sexe ou de chaque sexe si les deux sont utilisés dans chaque groupe (et d'un nombre inférieur dans le groupe témoin positif concomitant – voir paragraphe 29). Si l'exposition humaine est spécifique pour un sexe, dans le cas par exemple de certains produits pharmaceutiques, l'essai sera pratiqué sur des animaux du sexe approprié. À titre d'information concernant le nombre maximum d'animaux généralement requis, une étude conduite selon les paramètres établis au paragraphe 33, impliquant trois groupes de traitement et des groupes concurrents de témoins négatifs et de témoins positifs (chaque groupe étant composé de cinq animaux du même sexe) nécessitera entre 25 et 35 animaux.

Programme de traitement

33. Les animaux doivent recevoir un traitement quotidien sur une période de 2 jours ou plus (c'est à dire deux traitements ou plus à intervalles de 24 heures environ), et les échantillons doivent être collectés une fois à 2-6 h (ou à T_{max}) après le dernier traitement (12). Des échantillons provenant de programmes de traitement prolongés (dose quotidienne pendant 28 jours, par exemple) sont acceptables. Il a été démontré que le test des comètes pouvait être combiné avec succès au test des micronoyaux sur érythrocytes (10) (19). Cependant, il convient d'accorder une grande attention à la logistique nécessaire pour pratiquer l'échantillonnage des tissus en vue du test des comètes tout en respectant les exigences relatives à celui effectué en vue d'autres types d'évaluations toxicologiques. La collecte 24 h après la dernière dose, classique pour une étude de toxicité générale, n'est pas appropriée dans la plupart des cas (voir le paragraphe 40 sur le moment d'échantillonnage). L'utilisation d'autres programmes de traitement et d'échantillonnage devra être justifiée (voir annexe 3). On pourra par exemple recourir à un traitement

unique avec échantillonnages multiples, mais une étude comportant une seule administration nécessitera plus d'animaux, plusieurs moments d'échantillonnage étant requis ; cette solution peut toutefois être préférable dans certains cas, par exemple lorsque la substance testée induit une toxicité excessive en cas d'administrations répétées.

34. Quelle que soit la façon dont l'essai est réalisé, elle est acceptable si le produit chimique testé donne une réponse positive ou, en cas de réponse négative, si une preuve directe ou indirecte de l'exposition du/des tissu(s) cible(s) ou de la toxicité pour ce(s) tissu(s) est apportée, ou si la dose limite est atteinte (voir paragraphe 37).

35. Pour faciliter l'administration de volumes importants du produit chimique d'essai, celle-ci peut aussi être fractionnée, à raison de deux traitements le même jour à intervalle de deux à trois heures maximum. En pareil cas, le moment d'échantillonnage sera fixé en fonction du moment d'administration de la dernière fraction (voir paragraphe 40).

Niveaux de dose

36. Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables provenant d'autres études pertinentes pour orienter le choix des doses, l'étude préliminaire doit être effectuée dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale, selon les principes en vigueur pour la conduite des études de détermination des doses. Cette étude devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose induisant de légers effets toxiques liés à la durée de l'étude (avec des signes cliniques clairs tels qu'un comportement ou des réactions anormales, une perte pondérale mineure ou un effet cytotoxique sur un tissu cible, par exemple), mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant de sacrifier les animaux. Pour un produit chimique non toxique administré sur une période de 14 jours ou plus, la dose (limite) maximale est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour des périodes d'administration inférieures à 14 jours, la dose (limite) maximale est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour certains types de produits chimiques d'essai (produits pharmaceutiques à usage humain, par exemple) faisant l'objet de réglementations spécifiques, ces limites peuvent être différentes.

37. Les substances chimiques testées dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées ou qui induisent un processus de détoxification pouvant se traduire par une baisse de l'exposition après une administration à long terme peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées au cas par cas.

38. Pour les versions aiguë et subaiguë du test des comètes, outre la dose maximale (DMT, dose maximale possible, exposition maximale ou dose limite), une série supplémentaire d'au moins deux doses décroissantes présentant des écarts adaptés (facteur inférieur à $\sqrt{10}$, de préférence) doit être sélectionnée pour chaque moment d'échantillonnage afin de mettre en évidence d'éventuelles relations dose-effet. Cependant, les niveaux de dose utilisés doivent aussi couvrir dans la mesure du possible un intervalle compris entre la dose maximale et une dose produisant peu ou pas d'effet toxique. Lorsqu'une toxicité pour un tissu cible est observée à tous les niveaux de dose administrés, il est conseillé de procéder à des études complémentaires à des doses non toxiques (voir paragraphes 54-55). Les études visant à établir plus précisément l'allure de la courbe dose-réponse peuvent nécessiter un ou plusieurs groupes de traitement supplémentaires.

Administration des doses

39. Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, l'implantation ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse, orale (par gavage) et intratrachéale sont autant de choix valables, sous réserve qu'ils soient justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du/des tissu(s) cible(s). L'injection intrapéritonéale n'est généralement pas recommandée, car elle n'est pas représentative de l'exposition humaine, et ne sera utilisée qu'en cas de justification spécifique (par exemple pour certaines substances chimiques utilisées comme témoins positifs, à des fins d'investigation, ou pour des médicaments administrés par voie intrapéritonéale). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où l'on peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. L'utilisation de volumes plus importants (si elle est autorisée par la législation relative au bien-être animal) doit être justifiée. Chaque fois que cela est possible, les différents niveaux de dose doivent être obtenus en ajustant la concentration de la formulation administrée pour assurer à tous les niveaux de dose un volume constant rapporté au poids corporel.

Moment d'échantillonnage

40. Le moment d'échantillonnage est une variable critique car il dépend de la période nécessaire pour que les substances chimiques atteignent leur concentration maximale dans le tissu cible et que des cassures de brins d'ADN soient induites, mais doit se situer avant que ces cassures ne disparaissent, ne soient réparées ou ne provoquent la mort de la cellule. La persistance de certaines des lésions conduisant aux cassures de brins d'ADN détectées par le test des comètes peut être très brève, du moins pour certains produits chimiques testés *in vitro* (52) (53). En conséquence, si des lésions transitoires de ce type sont suspectées, des mesures doivent être prises pour en limiter la disparition, en s'assurant que les tissus sont échantillonnés suffisamment tôt, éventuellement avant les délais par défaut indiqués ci-dessous. Le moment d'échantillonnage optimal peut dépendre de la substance chimique ou de la voie d'administration, se traduisant en général par une exposition rapide du tissu lors d'une administration par voie intraveineuse ou par inhalation. Par conséquent, les moments d'échantillonnage seront déterminés en fonction des données cinétiques, quand elles sont disponibles (par exemple, temps (T_{max}) auquel le pic de concentration (C_{max}) dans le plasma ou le tissu est atteint, ou à l'état stationnaire en cas d'administrations multiples). En l'absence de données cinétiques, un compromis approprié pour la mesure de la génotoxicité est l'échantillonnage à 2-6 h du dernier traitement pour deux traitements ou plus, ou à 2-6 h et à 16-26 h d'une administration unique, mais il faut veiller à nécropsier tous les animaux au même moment après la dernière (ou l'unique) dose. Des informations sur la survenue d'effets toxiques dans les organes cibles (lorsqu'elles sont disponibles) peuvent également être utilisées pour sélectionner les moments d'échantillonnage appropriés.

Observations

41. Des observations cliniques générales relatives à la santé des animaux seront recueillies et consignées au moins une fois par jour, de préférence à la ou aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration (54). Au moins deux fois par jour, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Dans les études de longue durée, tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine et à la fin de l'essai. La consommation d'aliments doit être mesurée à chaque renouvellement des aliments et au moins une fois par semaine. Si le produit chimique testé est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes

non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai, et ne sont généralement pas utilisés pour le test des comètes.

Collecte des tissus

42. L'induction de cassures des brins d'ADN (comètes) pouvant être étudiée sur pratiquement tous les tissus, la justification du choix du/des tissu(s) à prélever doit être clairement établie, compte tenu de la raison présidant à la conduite de l'étude et de l'ensemble des données disponibles sur l'ADME, la génotoxicité, la cancérogénicité ou d'autres effets toxiques des substances chimiques étudiées. La voie d'administration (fondée sur la/les voie(s) d'exposition humaine potentielle(s)), la distribution et l'absorption tissulaires prévues, le rôle du métabolisme et le mécanisme d'action possible des substances chimiques étudiées sont des facteurs importants à prendre en considération. Le foie est le tissu qui a été le plus fréquemment étudié et sur lequel les données sont les plus nombreuses. C'est pourquoi, en l'absence de données préexistantes et d'éléments incitant à choisir un tissu donné, le choix du foie est justifié par le fait que c'est le siège principal du métabolisme des xénobiotiques et qu'il est souvent fortement exposé tant aux substances chimiques initiales qu'à leur(s) métabolite(s). Dans certains cas, l'examen d'un site de contact direct (l'estomac glandulaire ou le duodénum/jéjunum pour les substances administrées par voie orale, par exemple, ou les poumons pour les substances inhalées) peut être particulièrement indiqué. Des tissus complémentaires ou différents pourront être sélectionnés compte tenu des raisons justifiant la conduite du test, mais il peut être utile d'examiner différents tissus prélevés sur les mêmes animaux, à condition que le laboratoire ait fait la preuve de ses compétences pour ces tissus et de son aptitude à manipuler simultanément différents tissus.

Préparation des prélèvements

43. Pour les opérations décrites dans les paragraphes suivants (44-49), il importe que toutes les solutions ou suspensions stables soient utilisées avant leur date d'expiration, ou que des solutions ou suspensions fraîches soient préparées si nécessaire. De plus, dans ce qui suit, le temps passé à (i) prélever chaque tissu après la nécropsie, (ii) traiter chaque tissu pour obtenir des suspensions de cellules/noyaux, et (iii) traiter la suspension et préparer les lames, est considéré chaque fois comme une variable critique (voir définitions à l'annexe 1), et des durées acceptables pour chacune de ces étapes doivent avoir été fixées lors de l'établissement de la méthode et de la démonstration des compétences du laboratoire.

44. Les animaux seront sacrifiés conformément à la législation en vigueur sur le bien-être animal et à la règle des 3R, au(x) moment(s) approprié(s) après la dernière administration du produit chimique d'essai. Le(s) tissu(s) sélectionné(s) est/sont prélevé(s), disséqué(s), une portion est collectée pour le test des comètes et, au même moment, un échantillon de la même partie du tissu est découpé et placé dans une solution de formaldéhyde ou un fixateur approprié pour une éventuelle analyse histopathologique (voir paragraphe 55) selon les méthodes standards (12). Le tissu destiné au test des comètes est placé dans du tampon de broyage, rincé soigneusement au tampon de broyage froid pour éliminer le sang résiduel, et conservé dans du tampon de broyage glacé jusqu'au traitement. Une perfusion *in situ* peut aussi être pratiquée pour le foie ou les reins, par exemple.

45. Un grand nombre de méthodes d'isolement des cellules/noyaux ont été publiées. Elles incluent le broyage de tissus tels que ceux du foie ou des reins, le raclage de la surface des muqueuses dans le cas du tractus gastro-intestinal, l'homogénéisation et la digestion enzymatique. Les essais de validation du JaCVAM n'ont porté que sur des cellules isolées ; pour l'établissement de la méthode et pour pouvoir faire référence aux essais de validation du JaCVAM lors de la démonstration des compétences, on préférera donc les cellules isolées. Cependant, il a été établi que les résultats du test ne diffèrent pas fondamentalement selon que l'on a recours à des cellules ou des noyaux isolés (8). De même, différentes

méthodes d'isolement des cellules/noyaux (homogénéisation, broyage, digestion enzymatique et filtration sur tamis) ont donné des résultats comparables (55). On peut donc utiliser soit des cellules isolées soit des noyaux isolés. Le laboratoire évaluera et validera soigneusement les méthodes d'isolement des cellules/noyaux par type de tissu. Comme indiqué au paragraphe 40, la persistance de certaines des lésions conduisant à des cassures de brins d'ADN détectées par le test des comètes peut être très brève (40) (41). Quelle que soit la méthode employée pour préparer les suspensions de cellules/noyaux isolés, il importe donc que les tissus soient traités dès que possible après que les animaux ont été sacrifiés, et placés dans des conditions visant à réduire la disparition des lésions (maintien des tissus à basse température, par exemple). Il convient de conserver les suspensions cellulaires à très basse température jusqu'à ce qu'elles soient prêtes à être utilisées, afin de pouvoir mettre en évidence une variation inter-échantillons minimale et des réponses appropriées chez les témoins positifs et négatifs.

Préparation des lames

46. La préparation des lames doit intervenir dès que possible après la préparation des cellules/noyaux isolés (dans l'heure qui suit, idéalement), mais la température et le temps écoulé entre le sacrifice des animaux et la préparation des lames doivent être rigoureusement contrôlés et validés dans les conditions du laboratoire. Le volume de suspension cellulaire ajouté à l'agarose à bas point de fusion (habituellement de 0.5 à 1.0 %) pour préparer les lames ne doit pas réduire le pourcentage d'agarose à bas point de fusion à moins de 0.45 %. La densité optimale de cellules sera déterminée par le système d'analyse d'image utilisé pour le comptage des comètes.

Lyse

47. Les conditions de lyse constituent également une variable critique pouvant interférer avec les cassures de brins résultant d'un type spécifique de modifications de l'ADN (alkylations et formation d'adduits aux bases de l'ADN). Il est donc recommandé de maintenir les conditions de lyse aussi constantes que possible pour toutes les lames au cours d'une même expérimentation. Une fois préparées, les lames sont immergées dans une solution de lyse réfrigérée pendant au moins une heure (ou toute une nuit) à une température de l'ordre de 2 à 8 °C, en lumière tamisée (lumière jaune, par exemple) ou en environnement étanche à la lumière, pour éviter l'exposition à la lumière blanche, qui peut contenir des composantes UV. Après cette période d'incubation, on rince les lames pour les débarrasser du détergent et des sels résiduels avant l'étape de déroulement alcalin. On utilisera pour ce faire de l'eau purifiée, un tampon neutralisant ou un tampon phosphate. Un tampon d'électrophorèse peut également être utilisé. L'objectif est de maintenir des conditions alcalines dans la chambre d'électrophorèse.

Déroulement et électrophorèse

48. Les lames sont placées de façon aléatoire sur le plateau d'une unité d'électrophorèse sur gels immergés contenant suffisamment de solution d'électrophorèse pour que la surface des lames soit entièrement recouverte (la profondeur d'immersion doit, elle aussi, être cohérente d'une épreuve à l'autre). Dans certaines unités d'électrophorèse utilisées pour le test des comètes, à refroidissement actif, circulation du liquide de refroidissement et alimentation haute tension, l'intensité du courant électrique sera d'autant plus forte que la hauteur de solution sera élevée, à tension constante. Les lames doivent être réparties de façon équilibrée dans la cuve d'électrophorèse afin d'atténuer les effets d'éventuelles tendances ou les effets de bord dans la cuve et de limiter les variations entre lots ; il faut donc que pour chaque épreuve d'électrophorèse, on utilise le même nombre de lames provenant de chaque animal, et des échantillons des différents groupes de doses, des témoins négatifs et des témoins positifs. Les lames doivent rester au moins 20 minutes dans la cuve pour que l'ADN se déroule, puis sont soumises à l'électrophorèse dans des conditions contrôlées assurant une sensibilité et une plage dynamique maximales pour l'essai (c'est-à-dire

garantissant des pourcentages d'ADN de queue acceptables, chez les témoins négatifs et positifs, pour assurer une sensibilité maximale). Le degré de migration de l'ADN est proportionnel à la durée de l'électrophorèse, ainsi qu'au potentiel (V/cm). D'après les essais du JaCVAM, celui-ci pourrait être de 0.7 V/cm pendant au moins 20 minutes. La durée de l'électrophorèse est considérée comme une variable critique et le temps d'électrophorèse doit être réglé de façon à optimiser la plage dynamique. Des durées plus longues (30 ou 40 minutes, par exemple, pour gagner en sensibilité) se traduisent habituellement par des réponses positives plus nettes pour des mutagènes connus. Cependant, un allongement de la durée de l'électrophorèse peut aussi se traduire par une migration excessive dans les échantillons témoins. Chaque expérience doit être réalisée à tension constante, et la variabilité des autres paramètres doit se situer dans une plage étroite et spécifiée, par exemple, dans les essais du JaCVAM, 0.7 V/cm avec une intensité initiale de 300 mA. La profondeur du tampon doit être ajustée pour réaliser les conditions requises, et maintenue tout au long de l'expérimentation. Il convient de consigner l'intensité du courant au début et à la fin de l'électrophorèse. Les conditions optimales doivent donc être déterminées au cours de la démonstration initiale de compétences par le laboratoire pour chaque tissu étudié. La température de la solution d'électrophorèse au cours du déroulement et de l'électrophorèse doit être maintenue à un niveau bas (2-10 °C, habituellement) (10). Il convient de consigner la température de la solution d'électrophorèse au début du déroulement, au début de l'électrophorèse et à la fin de l'électrophorèse.

49. Une fois l'électrophorèse terminée, les lames doivent être immergées/rincées dans le tampon de neutralisation pendant au moins 5 minutes. Les gels peuvent être colorés et observés à l'état « frais » (pendant 1 à 2 jours, par exemple) ou être déshydratés et observés ultérieurement (dans un délai de une à deux semaines après la coloration, par exemple) (56). Cependant, ces conditions doivent être validées lors de la démonstration de compétences et les données historiques doivent être recueillies et conservées séparément pour chacune de ces options. Dans le second cas, les lames doivent être déshydratées par immersion dans l'éthanol absolu pendant au moins cinq minutes, séchées à l'air libre puis stockées, soit à température ambiante, soit dans un récipient conservé au réfrigérateur jusqu'à la lecture.

Méthodes de mesure

50. L'évaluation quantitative des comètes fait appel à un système d'analyse d'image automatique ou semi-automatique. Les lames sont colorées par un colorant fluorescent approprié – SYBR Gold, Green I, iodure de propidium ou bromure d'éthidium, par exemple – et observées à un grossissement approprié (200x, par exemple) au microscope à épifluorescence équipé de détecteurs appropriés ou d'une caméra numérique (CCD, par exemple).

51. Les cellules peuvent être classées en trois catégories décrites dans l'atlas des images de comètes (57), à savoir mesurable, non mesurable, cellule fantôme (voir le paragraphe 55 pour plus de précisions). Seules les cellules mesurables (tête et queue clairement définies, pas d'interférence avec les cellules voisines) doivent être classées en fonction du pourcentage d'ADN de queue, pour éviter les artefacts. Il n'est pas nécessaire d'indiquer la fréquence des cellules non mesurables. La fréquence des cellules fantômes est évaluée par un examen visuel (l'absence de tête clairement définie ayant pour conséquence que ces cellules ne sont pas bien détectées par le système d'analyse d'image) portant sur au moins 150 cellules par échantillon (voir paragraphe 56 pour plus de précisions) et mentionnée à part.

52. Toutes les lames, y compris celles des témoins négatifs et positifs, doivent être codées indépendamment et évaluées « en aveugle », afin que l'analyste ignore à quel traitement elles correspondent. Pour chaque échantillon (par tissu et par animal), au moins 150 cellules (en dehors des cellules fantômes – voir paragraphe 56) doivent être analysées. L'évaluation de 150 cellules par animal chez au moins 5 animaux par dose (mais moins de 5 dans le groupe témoin positif concomitant – voir paragraphe 29) assure une puissance statistique satisfaisante, selon l'analyse de Smith *et al.*, 2008 (5). Si

des lames sont utilisées, cela peut représenter l'évaluation de 2 ou 3 lames par échantillon pour des groupes de 5 animaux. Plusieurs zones de la lame doivent être observées à une densité garantissant l'absence de chevauchement des queues. L'évaluation en bord de lame est à éviter.

53. Les cassures de brins d'ADN dans le test des comètes peuvent être mesurées selon divers paramètres indépendants, tels que le pourcentage d'ADN de queue, la longueur de la queue ou le moment de la queue. Ces trois mesures peuvent être effectuées si l'on utilise un logiciel d'analyse d'image approprié. Cependant, le pourcentage d'ADN de queue (également appelé intensité de la queue) est recommandé pour l'évaluation et l'interprétation des résultats (12) (40) (41) (42) ; il est déterminé par l'intensité des fragments d'ADN présents dans la queue, exprimée en pourcentage de l'intensité totale de la cellule (13).

Lésion des tissus et cytotoxicité

54. Des résultats positifs au test des comètes peuvent ne pas être dus exclusivement à la génotoxicité, la toxicité pour les tissus cibles pouvant aussi se traduire par une augmentation de la migration de l'ADN (12) (41). À l'inverse, une cytotoxicité faible ou modérée est souvent observée dans le cas des substances génotoxiques connues (12) ; le test des comètes ne permet donc pas à lui seul de distinguer une migration de l'ADN induite par la génotoxicité d'une migration induite par la cytotoxicité. Toutefois, lorsqu'une augmentation de la migration de l'ADN est observée, il est recommandé d'étudier au moins un indicateur de cytotoxicité, ce qui peut aider à interpréter les résultats. Une augmentation de la migration de l'ADN en présence d'éléments attestant clairement de la cytotoxicité d'un produit doit être interprétée avec prudence.

55. De nombreux critères de cytotoxicité ont été proposés et parmi eux, les altérations histopathologiques sont considérées comme fournissant une bonne évaluation de la toxicité tissulaire. Des observations telles qu'une inflammation, une infiltration cellulaire ou des modifications apoptotiques ou nécrotiques ont été associées à une augmentation de la migration de l'ADN ; cependant, comme l'ont montré les essais de validation du JaCVAM (12), il n'existe pas de liste définitive de modifications histopathologiques systématiquement associées à une migration accrue de l'ADN. Les modifications de certains paramètres biologiques (AST, ALT, par exemple) peuvent aussi fournir des informations utiles sur les lésions des tissus, et d'autres indicateurs, tels que l'activation des caspases, le marquage des cellules apoptotiques par la méthode TUNEL, la coloration à l'annexine V, etc., peuvent aussi être envisagés. Cependant, les données publiées sur l'utilisation de ces indicateurs dans des études *in vivo* sont limitées et ne sont peut-être pas toutes également fiables.

56. Les cellules fantômes sont des cellules dont l'image au microscope consiste en une tête de petite taille ou inexistante et une grande queue diffuse, et qui sont considérées comme très endommagées, bien que l'étiologie de ce phénomène soit incertaine (voir annexe 3). Du fait de leur apparence, la mesure du pourcentage d'ADN dans la queue par analyse d'image n'est pas fiable, et il convient donc de les évaluer séparément. L'occurrence de cellules fantômes doit être consignée et signalée, et toute augmentation importante de leur nombre attribuée au composé testé doit être investiguée et interprétée avec soin. La connaissance du mode d'action potentiel des substances chimiques d'essai peut constituer une aide à cet égard.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

57. L'animal étant l'unité expérimentale, il convient de présenter sous forme de tableau les données

animales individuelles et la synthèse des résultats. Du fait de la nature hiérarchique des données, il est recommandé de déterminer pour chaque lame le pourcentage médian d'ADN de queue et de calculer pour chaque animal la moyenne des médianes (12). La moyenne d'un groupe est obtenue en faisant la moyenne des moyennes individuelles des animaux qui le composent. Toutes ces valeurs doivent figurer dans le rapport. D'autres démarches peuvent être appliquées (voir paragraphe 53) si cela est justifié d'un point de vue scientifique et statistique. Pour l'analyse statistique, diverses approches sont possibles (58) (59) (60) (61). Lors du choix des méthodes statistiques, on tiendra compte de la nécessité de transformer éventuellement les données (en logarithmes ou en racines carrées, par exemple) et/ou d'ajouter un petit nombre (0.001, par exemple) à toutes les valeurs (même non nulles) pour atténuer l'incidence des valeurs nulles, comme il est expliqué dans les références ci-dessus. On trouvera à l'annexe 2 des précisions sur l'analyse des interactions traitement/sexe lorsque des animaux des deux sexes sont utilisés, et sur l'analyse subséquente des données selon que des différences sont observées ou non. Des données sur la toxicité et les signes cliniques doivent également figurer dans le rapport.

Critères d'acceptabilité

58. 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 16).
 - Les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 29) 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 au témoin négatif concomitant.
 - Un nombre adéquat de cellules et de doses ont été analysées (paragraphe 50 et 36-38).
 - Les critères de sélection de la dose la plus élevée sont cohérents avec ceux décrits au paragraphe 36.

Évaluation et interprétation des résultats

59. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si :
- au moins une des doses d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant,
 - un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose,
 - des résultats se situent à l'extérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques pour une espèce, un véhicule, une voie, un tissu et un nombre d'administrations donnés.

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des cassures de brins d'ADN dans les tissus étudiés dans ce système d'essai. Si un ou deux seulement de ces critères sont remplis, voir le paragraphe 62.

60. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si :
- aucune concentration d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concurrent,
 - 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 pour une espèce, un véhicule, une voie, un tissu et un nombre d'administrations donnés,
- d. une preuve directe ou indirecte de l'exposition du/des tissu(s) cible(s) ou de la toxicité pour ce(s) tissu(s) est apportée.

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des cassures de brins d'ADN dans les tissus étudiés dans ce système d'essai.

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

62. Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive (c'est-à-dire que tous les critères des paragraphes 59 ou 60 ne sont pas remplis) et afin d'établir la signification biologique d'un résultat, les données doivent être soumises à un jugement d'expert et/ou des investigations plus poussées si cela est justifié d'un point de vue scientifique. Il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires (le cas échéant) ou de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales optimisées (espacement des doses, autres voies d'administration, autres moments d'échantillonnage ou autres tissus, par exemple).

63. 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.

64. Pour évaluer la signification biologique d'un résultat positif ou équivoque, des informations sur la cytotoxicité pour le tissu cible sont nécessaires (voir paragraphes 54-55). Lorsque des résultats positifs ou équivoques sont observés uniquement en présence de signes clairs de cytotoxicité, on conclura à une étude équivoque pour ce qui est de la génotoxicité, à moins de disposer d'informations suffisantes pour permettre une conclusion définitive. En cas de résultats négatifs s'accompagnant de signes de toxicité à toutes les doses, il peut être judicieux de procéder à une étude complémentaire à des doses non toxiques.

Rapport d'essai

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

Produit chimique d'essai :

- source, numéro de lot s'il est disponible ;
- stabilité du produit chimique d'essai, date limite d'utilisation, ou date de réanalyse, si elle est connue ;

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/véhicule :

- justification du choix du solvant/véhicule ;
- solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues ;
- préparation des formulations à administrer ;
- déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple) ;

Animaux d'essai :

- espèce/souche utilisée et justifications scientifiques et éthiques ;
- nombre, âge et sexe des animaux ;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, enrichissement environnemental, etc. ;
- poids individuel des animaux au début et à la fin de l'essai, y compris fourchette, moyenne et écart type pour chaque groupe ;

Conditions de l'essai :

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule) ;
- résultats de l'étude de détermination des doses (le cas échéant) ;
- justification du choix des doses ;
- détails sur la préparation du produit chimique d'essai ;
- détails sur l'administration du produit chimique d'essai ;
- justification de la voie d'administration ;
- site d'injection (pour les études par voie sous-cutanée ou intraveineuse) ;
- méthodes de préparation des échantillons, analyses histopathologiques le cas échéant, en particulier pour les substances donnant un résultat positif au test des comètes ;
- justification de la sélection du tissu ;
- méthodes permettant de vérifier que le produit chimique d'essai a atteint le tissu cible ou la circulation sanguine en cas de résultats négatifs ;
- dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (ppm) et de la consommation, s'il y a lieu ;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau ;
- description détaillée des programmes de traitement et d'échantillonnage et justification des choix (données toxicocinétiques éventuelles, par exemple) ;
- méthode d'analgésie ;
- méthode employée pour sacrifier les animaux ;
- procédures d'isolement et de conservation des tissus ;
- méthodes de préparation de la suspension de cellules/noyaux isolés ;
- source et numéros de lots de tous les réactifs (lorsque c'est possible) ;
- méthodes d'évaluation de la cytotoxicité ;
- conditions d'électrophorèse ;
- techniques de coloration utilisées ;
- méthodes de comptage et de mesurage des comètes.

Résultats :

- Observations cliniques générales, s'il y a lieu, avant et pendant toute la durée de l'essai pour chaque animal ;
- données établissant la cytotoxicité, le cas échéant ;
- pour les études d'une durée supérieure à une semaine : évolution du poids corporel de chaque animal au cours de l'étude, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart type pour chaque groupe ; nourriture consommée ;

- relation dose-réponse, le cas échéant ;
- pour chaque tissu/animal, pourcentage d'ADN de queue (ou autre donnée, selon le paramètre choisi), valeurs médianes par lame, valeurs moyennes par animal et valeurs moyennes par groupe ;
- données relatives aux témoins négatifs concomitants et aux témoins négatifs historiques, avec plages de valeurs, moyennes/médianes et écarts-types pour chaque tissu évalué ;
- données relatives aux témoins positifs concomitants et aux témoins positifs historiques ;
- pour les tissus autres que le foie, courbe dose-réponse correspondant au témoin positif. Cette courbe peut être établie à partir des données collectées au cours de l'établissement des compétences du laboratoire (voir paragraphes 16-17) et sera accompagnée d'une justification, avec des références à la littérature actuelle, montrant que l'ampleur et la dispersion des réponses aux témoins dans le tissu étudié sont appropriées ;
- analyses et méthodes statistiques employées ;
- critères appliqués pour considérer une réponse comme positive, négative ou équivoque ;
- fréquence des cellules fantômes dans chaque groupe et par animal.

Discussion des résultats

Conclusions

Références

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.
- (2) Brendler-Schwaab, S. et al. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.
- (3) Burlinson, B. et al. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.
- (5) Smith, C.C, et al. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.
- (6) Hartmann, A. et al. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.
- (7) McKelvey-Martin, V.J. et al (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.
- (8) Tice, R.R. et al. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.
- (9) Singh, N.P. et al. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.
- (10) Rothfuss, A. et al. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.
- (11) OECD (2014), "Draft Introduction document to the OECD Test Guidelines on genotoxicity", OECD Publishing, Paris.
- (12) OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.
- (13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet" assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.
- (14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.
- (15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.
- (16) Rothfuss, A. et al. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.
- (17) Kushwaha, S. et al. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145-54.
- (18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical

approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.

- (19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.
- (20) Recio, L. et al. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.
- (21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.
- (22) Hartmann, A. (2004), Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations, *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.
- (23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.
- (24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.
- (25) Toyozumi, T. et al. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.
- (26) Struwe, M. et al. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.
- (27) Wada, K. et al. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.
- (28) Wang, A. et al. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.
- (29) Burlinson, B. et al. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (30) Jackson, P. et al. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.
- (31) Sasaki, Y.F. et al. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.
- (32) Sekihashi, K. et al. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.
- (33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity, *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.
- (34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular

cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.

- (35) Cordelli, E. et al. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.
- (36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.
- (37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.
- (38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.
- (39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.
- (40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.
- (41) Burlinson, B. et al. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.
- (42) Kumaravel, T.S. et al. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.
- (43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.
- (44) Møller, P. et al. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.
- (45) Forchhammer, L. et al. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.
- (46) Azqueta, A. et al. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.
- (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*, John Wiley and Sons, New York 2nd ed.
- (49) Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123).
- (50) OCDE (2009), *Essai n° 412: Toxicité subaigüe par inhalation : étude sur 28 jours*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris.
doi : 10.1787/9789264070790-fr.
- (51) OCDE (2009), *Essai n° 413: Toxicité subchronique par inhalation : 90 jours*, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris.
doi : 10.1787/9789264070813-fr
- (52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese

hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.

- (53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.
- (54) OECD (2002), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.
- (56) Hartmann, A. et al. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45-51.
- (57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.
- (58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.
- (59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.
- (60) Bright, J. et al. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.
- (61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

ANNEXE 1**Définitions**

Électrophorèse de cellules isolées en gel d'agarose en conditions alcalines : technique sensible pour la détection de lésions primaires de l'ADN au niveau de cellules/noyaux individualisés.

Comète : nom donné à la forme que prennent les nucléoïdes soumis à un champ électrophorétique, en raison de sa similitude avec celle d'une comète : la tête correspond au noyau, et la queue est constituée de l'ADN migrant hors du noyau sous l'action du champ électrique.

Variable/paramètre critique : désigne une variable d'un protocole expérimental dont une modification mineure peut avoir une forte incidence sur la conclusion de l'essai. Les variables critiques peuvent être spécifiques d'un tissu. Il importe de ne pas modifier les variables critiques, particulièrement en cours d'essai, sans tenir compte de l'incidence de ces modifications sur la réponse à l'essai, signalée par exemple par l'ampleur et la variabilité de la réponse des témoins positifs et négatifs. Le rapport d'essai doit préciser les modifications apportées aux variables critiques au cours de l'essai, ou par rapport au protocole standard du laboratoire, et justifier chacune de ces modifications.

Intensité de la queue ou pourcentage d'ADN de queue : correspond à l'intensité de fluorescence de la queue de la comète rapportée à l'intensité totale (tête plus queue). Reflète l'ampleur des cassures de l'ADN, exprimée sous forme de pourcentage.

ANNEXE 2

Plan factoriel utilisé pour identifier des différences entre sexes dans le test des comètes *in vivo**Plan factoriel et analyse factorielle*

Selon cette démarche, un minimum de 5 mâles et de 5 femelles sont exposés à chaque concentration d'essai, ce qui conduit à utiliser un minimum de 40 animaux (20 mâles et 20 femelles, auxquels s'ajoutent les témoins positifs nécessaires).

La démarche décrite ici, qui correspond à l'une des formes simples du plan factoriel, équivaut à une analyse de variance à deux facteurs, dans laquelle le sexe et la concentration sont les facteurs principaux. Les données peuvent être analysées à l'aide de nombreux progiciels statistiques standard tels que SPSS, SAS, STATA ou Genstat, ou en utilisant le logiciel R.

À partir de l'ensemble de données, on détermine la variabilité entre les sexes, la variabilité entre les concentrations et la variabilité liée à l'interaction entre sexe et concentrations. Chacun de ces termes est comparé à une estimation de la variabilité entre les animaux répartis au sein des groupes d'animaux de même sexe exposés à la même concentration. On trouvera plus de précisions sur cette méthode dans les manuels de statistiques classiques (voir les références) et dans les fichiers d'aide fournis avec les logiciels statistiques.

On examine ensuite le terme d'interaction sexe x concentration dans un tableau ANOVA¹. En l'absence de terme d'interaction significatif, la combinaison des valeurs inter-sexes ou inter-niveaux de concentration permet de réaliser des tests statistiques valides entre les niveaux, en se basant sur le terme de variabilité intra-groupe combinée fourni par l'ANOVA.

L'analyse se poursuit par la partition de la variabilité estimée entre concentrations, de façon à obtenir des contrastes, ce qui permet d'établir les contrastes linéaires et quadratiques des réponses pour l'ensemble des niveaux de concentration. Lorsqu'il y a une interaction significative sexe x concentration, ce terme peut à son tour être partitionné en contrastes d'interaction linéaire x sexe et quadratique x sexe. Ces termes permettent de vérifier si les réponses aux concentrations sont parallèles pour les deux sexes ou si elles diffèrent selon le sexe.

L'estimation de la variabilité intra-groupe combinée peut servir à tester l'écart entre les moyennes en les comparant deux à deux. Ces comparaisons peuvent se faire entre les moyennes pour les deux sexes et entre les moyennes pour les différents niveaux de concentration (comparaisons avec les témoins négatifs, par exemple). En cas d'interaction significative, des comparaisons peuvent être faites entre les moyennes des différentes concentrations pour un même sexe, ou entre les moyennes des deux sexes à la même concentration.

¹ Les statisticiens qui suivent une démarche de modélisation telle que l'utilisation de modèles linéaires généralisés (MLG) peuvent conduire l'analyse d'une manière différente mais comparable ; toutefois, ils ne dériveront pas nécessairement le traditionnel tableau ANOVA, qui remonte à des conceptions algorithmiques du calcul statistique développées à une ère pré-informatique.

Références

De nombreux manuels de statistiques traitent de la théorie, de la conception, de la méthodologie, de l'analyse et de l'interprétation des plans factoriels, depuis les analyses les plus simples, à deux facteurs, jusqu'aux formes complexes utilisées dans la conception de l'expérimentation. La liste ci-dessous n'est pas exhaustive. Certains ouvrages comportent des exemples d'application de ce type de démarches, accompagnés parfois d'un code permettant l'exécution des analyses sous différents logiciels.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. et Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) *Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences*. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990) *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997) *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971) *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) *Experiments: Planning, Analysis and Optimization*. John Wiley & Sons Inc.

ANNEX 3

Limites actuelles de l'essai

Le test des comètes *in vivo* présente plusieurs limites liées à l'état actuel des connaissances. On peut s'attendre à ce que leur nombre diminue à l'avenir, ou à ce qu'elles soient définies de façon plus précise, à mesure que l'expérience acquise dans l'application du test apporte des réponses aux questions de sécurité, dans un contexte réglementaire.

1. Certains types de dommages à l'ADN peuvent être de courte durée, c'est-à-dire réparés trop rapidement pour être observables 24 heures ou plus après la dernière dose administrée. Il n'existe pas de liste validée des dommages de courte durée, ni des substances chimiques susceptibles de provoquer ce type de dommages, et l'on ignore combien de temps ces derniers restent détectables. Le moment d'échantillonnage optimal peut aussi être spécifique de la substance chimique ou de la voie d'administration, et les moments d'échantillonnage doivent être établis d'après les données cinétiques (temps T_{\max} auquel est atteint le pic de concentration dans le plasma ou le tissu, par exemple), lorsque ces données sont disponibles. La plupart des études de validation sur lesquelles s'appuie cette Ligne directrice précise que la nécropsie doit intervenir 2 ou 3 heures après l'administration de la dernière dose. La plupart des études publiées font état d'une administration de la dernière dose de 2 à 6 heures avant le sacrifice des animaux. C'est donc sur ces bases que cette Ligne directrice recommande d'administrer la dose finale à un moment spécifié entre 2 et 6 heures avant la nécropsie, sauf si des données incitent à procéder différemment.
2. Il n'existe pas de données validées relatives à la sensibilité du test pour la détection des dommages de courte durée à l'ADN consécutifs à l'administration dans les aliments ou l'eau de boisson, par comparaison avec l'administration par gavage. Des dommages à l'ADN ont été détectés après administration dans les aliments ou l'eau de boisson, mais les rapports d'essais réalisés par cette voie d'administration sont relativement peu nombreux, et l'on dispose d'une expérience beaucoup plus grande de l'administration par gavage ou par voie intrapéritonéale. La sensibilité du test pourrait donc être réduite dans le cas de composés induisant des dommages de courte durée, lorsque ces substances sont administrées dans les aliments ou l'eau de boisson.
3. Aucune étude interlaboratoires n'a été menée sur des tissus autres que le foie et l'estomac, et aucune recommandation n'a donc été établie sur la façon d'obtenir une réponse sensible et reproductible sur des tissus autres que le foie, avec par exemple les plages attendues pour les témoins positifs et négatifs. Pour le foie, il n'a pas non plus été possible de parvenir à un accord sur un abaissement de la limite pour les témoins négatifs.
4. Bien que plusieurs publications démontrent que la cytotoxicité *in vitro* constitue un facteur de confusion, très peu de données *in vivo* ont été publiées et il n'a donc pas été possible de recommander une mesure de cytotoxicité particulière. Des modifications histopathologiques telles qu'une inflammation, une infiltration cellulaire ou des modifications apoptotiques ou nécrotiques ont été associées à une augmentation de la migration de l'ADN ; cependant, comme l'ont montré les essais de validation du JaCVAM (OCDE, 2014), ces modifications ne s'accompagnent pas toujours de résultats positifs dans le test des comètes et, de ce fait, il n'existe pas de liste définitive de modifications histopathologiques systématiquement associées à une migration accrue de l'ADN. Il a été suggéré d'utiliser les cellules fantômes comme indicateur de cytotoxicité, mais leur étiologie est incertaine. Selon certaines données, elles pourraient résulter de la cytotoxicité des substances, de dommages mécaniques/à induction enzymatique déclenchés lors de la préparation des échantillons (Guerard *et al.*, 2014) et/ou d'un effet extrême de la génotoxicité du produit

chimique testé. D'autres données semblent indiquer qu'elles sont dues à des dommages importants mais peut-être réparables de l'ADN (Lorenzo *et al.*, 2013).

5. La possibilité a été établie de congeler des tissus ou des noyaux cellulaires pour les analyser ultérieurement. Cela se traduit généralement par un effet mesurable sur la réponse au véhicule et au témoin positif (Recio *et al.*, 2010 ; Recio *et al.*, 2012 . Jackson *et al.*, 2013). Si le laboratoire a recours à cette pratique, il doit démontrer sa compétence en matière de congélation, et confirmer que les valeurs du pourcentage d'ADN de queue dans les tissus cibles des animaux traités par le véhicule sont suffisamment basses et que des réponses positives peuvent encore être détectées. La littérature décrit plusieurs méthodes de congélation des tissus. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas d'accord sur la meilleure façon de congeler et décongeler les tissus ni comment évaluer si une réponse potentiellement altérée peut affecter la sensibilité de l'essai.
6. Des travaux récents montrent que l'on peut s'attendre à ce que le nombre de variables critiques continue de baisser et à ce que les paramètres relatifs à ces variables soient définis plus précisément (Guerard *et al.*, 2014).

Références

Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.

Jackson, P. et al. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

Lorenzo, Y. et al. (2013), The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead, *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.

OECD (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

Recio, L. et al. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.