

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

Essai *In Vitro* de Mutation Génique Sur Cellules de Mammifères Utilisant le Gène de la Thymidine Kinase

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 des considérations relatives au bien-être des animaux. Initialement, l'essai sur cellules de lymphome de souris (ou essai MLA, pour *Mouse Lymphoma Assay*) et l'essai sur TK6 utilisant des loci de la thymidine kinase (TK) figuraient dans la Ligne directrice pour les essais n° 476 adoptée en 1984 et révisée en 1997, sur la base des avancées scientifiques réalisées jusqu'alors. Par la suite, le groupe d'experts sur les cellules de lymphome de souris de l'atelier international sur les essais de génotoxicité (IWGT) a élaboré des recommandations internationales harmonisées pour les critères d'acceptation des essais et l'interprétation des données de l'essai MLA (1) (2) (3) (4) (5), et ces recommandations sont incorporées dans la présente Ligne directrice pour les essais (LD 490). La LD 490 est rédigée pour l'essai MLA ainsi que pour l'essai sur TK6, car ce dernier utilise également le locus TK. Cependant, alors que l'essai MLA est largement utilisé à des fins réglementaires, l'essai sur TK6 est utilisé bien moins fréquemment. Il est à noter que malgré la similitude de leurs critères d'évaluation, les deux lignées cellulaires ne sont pas interchangeables et des programmes réglementaires peuvent valider une préférence pour l'un par rapport à l'autre dans le cadre d'un usage réglementaire particulier. Par exemple, la validation du MLA a démontré sa pertinence pour la détection des dommages sur la structure des chromosomes causés par le produit chimique testé, en plus de la capacité de l'essai pour identifier les mutations géniques. Elle s'inscrit dans une série de lignes directrices sur la toxicologie génétique. Un document contenant des éléments d'information concis sur les essais de toxicologie génétique ainsi qu'un aperçu des récents changements qui ont été apportés à ces Lignes directrices a été développé (6).

2. Les essais *in vitro* de mutation génique sur cellules de mammifères ont pour objectif de détecter des mutations induites par des produits chimiques. Les lignées cellulaires utilisées dans ces essais mesurent les mutations directes dans les gènes rapporteurs, en particulier le gène endogène de la thymidine kinase (*TK* pour les cellules humaines et *Tk* pour les cellules de rongeurs, collectivement dénommés *TK* dans la présente Ligne directrice). Deux lignées cellulaires sont concernées par la présente Ligne directrice : la lignée de cellules de lymphome de souris L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C (généralement dénommée L5178Y) et la lignée de cellules humaines lymphoblastoïdes TK6 (généralement dénommée TK6). Bien que ces deux lignées cellulaires varient en raison de leur origine, croissance cellulaire, statut p53, etc., les essais de

mutation génique de la *TK* peuvent être menés de manière similaire dans les deux types de cellules décrits dans la présente Ligne directrice.

3. La nature autosomique et hétérozygote du gène de la thymidine kinase permet de détecter les colonies viables dont les cellules sont déficientes en enzyme thymidine kinase suite à la mutation de $TK^{+/-}$ en $TK^{-/-}$. Ce déficit peut résulter d'événements génétiques affectant le gène de la *TK*, notamment des mutations du gène (mutations ponctuelles, mutations décalant le cadre de lecture, petites délétions, etc.) et des événements chromosomiques (délétions importantes, réarrangements chromosomiques et recombinaison mitotique). Ces derniers événements sont exprimés par la perte d'hétérozygotie, qui est une modification génique courante des gènes suppresseurs lors de la tumorigenèse chez l'homme. En théorie, la perte de la totalité du chromosome portant le gène de la *TK* résultant de l'altération du fuseau et/ou de la non-disjonction mitotique peut être détectée dans l'essai MLA. En effet, l'analyse cytogénétique et moléculaire combinée montre clairement que certains mutants de la *TK* dans l'essai MLA sont le résultat d'une non-disjonction. Cependant, les données scientifiques démontrent que les tests de mutation génique de la *TK* ne peuvent pas détecter de manière fiable les substances aneugènes lors de l'application des critères de cytotoxicité standard (tels que décrits dans la présente Ligne directrice) et que par conséquent, il ne convient pas d'utiliser ces tests pour détecter ces dernières (7) (8) (9).

4. Deux classes phénotypiques distinctes de mutants de la *TK* sont générées lors des essais de mutation génique de la *TK* ; les mutants dont la croissance est normale qui grandissent à la même vitesse que les cellules *TK* hétérozygotes, et les mutants à la croissance faible qui grandissent avec des temps de doublement plus longs. Les mutants à la croissance normale et à la croissance faible sont reconnus sous forme de grande colonie ou de petite colonie de mutants dans l'essai MLA, et en tant que colonie de mutants apparaissant précocement ou tardivement dans l'essai sur TK6. La nature moléculaire et cytogénétique des deux sortes de colonies de mutants dans l'essai MLA (petites et grandes) a été étudiée en détail (8) (10) (11) (12) (13). La nature moléculaire et cytogénétique des mutants TK6 apparaissant précocement et tardivement a aussi été largement étudiée (14) (15) (16) (18). Les mutants à la croissance lente pour les deux types de cellules ont subi des lésions génétiques impliquant le ou les gènes régulateurs présumés de la croissance situés près du locus *TK*, ce qui entraîne des temps de doublement plus longs et la formation de petites colonies ou de colonies apparaissant tardivement (18). L'induction de mutants à croissance lente a été associée à des substances qui induisent des changements structurels bruts au niveau chromosomique. Les cellules dont les lésions n'impliquent pas de gènes régulateurs présumés de la croissance près du locus *TK* grandissent à des vitesses similaires à celles des cellules parentales et deviennent des mutants à la croissance normale. L'induction de mutants à la croissance essentiellement normale est associée à des substances agissant principalement comme mutagènes ponctuels. En conséquence, il est essentiel de comptabiliser à la fois les mutants à croissance lente et les mutants à croissance normale afin de détecter tous les mutants et de fournir des informations sur le ou les types de lésions (mutagènes par rapport à clastogènes) induits par le produit chimique testé (10) (12) (18) (19).

5. La Ligne directrice est organisée de manière à fournir des informations générales qui s'appliquent aux essais sur cellules de lymphome de souris (MLA) et sur TK6, ainsi que des indications particulières pour les essais individuels.

6. Les définitions des termes employés sont présentées à l'annexe 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

7. Les essais conduits *in vitro* requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique, mais celle-ci est incapable de reproduire parfaitement les conditions *in vivo*.

8. On prendra soin d'éviter les conditions susceptibles de conduire à de faux résultats positifs (à savoir une possible interaction avec le système d'essai) non causés par une interaction entre le produit chimique d'essai et le matériel génétique de la cellule ; ces conditions peuvent être une modification du pH ou de l'osmolalité, une interaction avec les composants du milieu (20) (21), ou une cytotoxicité excessive (22) (23) (24). Une cytotoxicité supérieure aux plafonds recommandés tels que définis au paragraphe 28 est considérée comme excessive pour les essais MLA et sur TK6. En outre, il convient de noter que les produits chimiques d'essai qui sont des analogues de la thymidine, ou qui se comportent comme des analogues de la thymidine, peuvent augmenter la fréquence des mutants par croissance sélective des mutants spontanés de fond lors du traitement cellulaire, et que leur évaluation nécessite le recours à des méthodes d'essai additionnelles (25).

9. Pour les nanomatériaux manufacturés, il peut s'avérer nécessaire d'apporter certaines adaptations spécifiques à cette Ligne directrice, mais ces adaptations ne sont pas décrites ici.

10. Avant d'appliquer la présente Ligne directrice à un mélange pour obtenir des données à des fins réglementaires, il convient de vérifier si, et dans l'affirmative pourquoi, elle peut fournir des résultats acceptables dans ce cadre réglementaire. Cette vérification n'est pas nécessaire si l'essai du mélange répond à des exigences réglementaires.

11. Des cellules déficientes en thymidine kinase (TK), en raison de la mutation directe TK^{+/-} en TK^{-/-}, sont résistantes aux effets cytostatiques de la trifluorothymidine (TFT), un analogue de la pyrimidine. Les cellules riches en TK sont sensibles à la TFT, qui entraîne une inhibition du métabolisme et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, des cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TFT et former des colonies visibles, tandis que les cellules normales qui contiennent l'enzyme TK ne le peuvent pas.

PRINCIPE DE L'ESSAI

12. Des cellules en suspension sont exposées au produit chimique d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique (voir paragraphe 19), pendant une période de temps appropriée (voir paragraphe 32), puis sont repiquées afin de déterminer la cytotoxicité et de laisser le phénotype s'exprimer avant la sélection des mutants. On détermine la cytotoxicité en mesurant la croissance relative totale des cultures (CRT, voir paragraphe 25) pour l'essai MLA et la survie relative (SR, voir paragraphe 26) pour l'essai sur TK6. Les cultures traitées sont maintenues dans un milieu de croissance pendant une période de temps suffisante, caractéristique de chaque type de cellule (voir paragraphe 37), afin de permettre une expression phénotypique quasi-optimale des mutations induites. Une fois l'expression phénotypique obtenue, on détermine la fréquence des mutants en ensemençant avec un nombre connu de colonies un milieu contenant l'agent sélectif permettant de détecter les colonies mutantes. Dans un milieu exempt d'agent sélectif, on détermine l'efficacité de clonage (viabilité). Après un temps d'incubation approprié, les colonies sont comptées. La fréquence des mutants est calculée en fonction du nombre de colonies mutantes corrigé par l'efficacité de clonage au moment de la sélection des mutants.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Cellules

13. Pour l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA) : L'essai MLA ayant été développé et caractérisé en utilisant la sous-lignée TK^{+/-}-3.7.2C de cellules L5178Y, c'est cette sous-lignée spécifique

qui doit être utilisée pour cet essai. La lignée cellulaire L5178Y est dérivée d'un lymphome thymique induit par méthylcholanthrène provenant d'une souris DBA-2 (26). Clive et ses collègues ont traité des cellules L5178Y (désignées par Clive sous le nom de TK^{+/+}-3) avec du méthanesulfonate d'éthyle et isolé un clone de TK^{-/-} (désigné sous le nom de TK^{-/-}-3.7) en utilisant de la bromodéoxyuridine comme agent sélectif. Un clone spontané TK^{+/-} (désigné sous le nom de TK^{+/-}-3.7.2.) et un sous-clone (désigné sous le nom de TK^{+/-}-3.7.2C) ont été isolés à partir du clone TK^{-/-} et caractérisés pour être utilisés dans l'essai MLA (27). Le caryotype de la lignée cellulaire a fait l'objet d'une publication (28) (29) (30) (31). Le nombre modal de chromosomes est 40. Un chromosome métacentrique (t12 ; 13) doit être compté comme un chromosome. Le locus *TK* de la souris est situé sur l'extrémité distale du chromosome 11. La lignée de cellules L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C comporte des mutations sur les deux allèles du gène p53 et produit une protéine p53 mutée (32) (33). C'est probablement grâce au statut du gène p53 de la lignée cellulaire TK^{+/-}-3.7.2C que l'essai est capable de détecter des lésions à grande échelle (17).

14. Pour l'essai sur TK6 : La lignée TK6 est une lignée de cellules humaines lymphoblastoïdes. La lignée cellulaire parentale est une lignée cellulaire transformée par le virus d'Epstein-Barr, WI-L2, initialement dérivée d'un sujet de sexe masculin âgé de 5 ans atteint de sphérocytose héréditaire. Le premier clone isolé, HH4, a été mutagénisé avec de l'ICR191 et une lignée de cellules *TK* hétérozygotes, baptisées K6, a été ainsi générée (34). Les cellules TK6 sont presque toutes diploïdes et le caryotype représentatif est 47, XY, 13+, t(14; 20), t(3; 21) (35). Le locus *TK* chez l'homme est situé sur le bras long du chromosome 17. La lignée TK6 est une lignée de cellules compétentes en p53, car elle comporte une séquence p53 de type sauvage dans les deux allèles et exprime seulement la protéine p53 de type sauvage (36).

15. Lors de l'établissement initial de la culture mère ou de sa reconstitution pour les essais MLA et sur TK6, il est recommandé que le laboratoire d'essai veille à l'absence de contamination par *mycoplasmes*, procède au caryotypage des cellules ou peigne les chromosomes hébergeant le locus *TK*, et vérifie les temps de doublement de la population. La durée normale du cycle cellulaire des cellules utilisées dans le laboratoire d'essai doit être établie et doit correspondre aux caractéristiques cellulaires publiées (16) (19) (37). Cette culture mère doit être conservée à -150 °C ou à une température inférieure et utilisée pour préparer les cultures cellulaires de travail.

16. Avant de produire un grand nombre de cultures de travail cryoconservées ou juste avant d'être utilisées pour une expérience, il pourra s'avérer nécessaire de débarrasser la culture des cellules mutantes qu'elles contiennent [sauf si la fréquence des mutants (FM) dans le témoin avec solvant figure déjà dans la plage de valeurs acceptables — voir le tableau 2 pour l'essai MLA]. On utilise pour cela le méthotrexate (aminoptérine) afin d'écartier les cellules déficientes en TK et on ajoute de la thymidine, de l'hypoxanthine et de la glycine (L5178Y) ou de la 2'-déoxycytidine (TK6) à la culture afin de garantir une croissance optimale des cellules compétentes en TK (19) (38) (39) (40). Des conseils d'ordre général sur les bonnes pratiques concernant l'entretien des cultures cellulaires ainsi que des conseils spécifiques pour les cellules L5178Y et TK6 sont disponibles dans la littérature (19) (31) (37) (39) (41). Pour les laboratoires ayant besoin de cultures cellulaires mères pour lancer un essai sur cellules de lymphome de souris ou TK6 ou pour obtenir de nouvelles cultures cellulaires mères, une banque de cellules bien caractérisées est disponible (37).

Milieu et conditions de culture

17. Pour les deux essais, il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (par exemple, récipients de culture, atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂, température d'incubation de 37 °C) appropriés pour la conservation des cultures. Les cultures cellulaires doivent toujours être maintenues dans des conditions qui garantissent leur croissance en phase exponentielle. Il est

particulièrement important de choisir des milieux et des conditions de culture qui stimulent la croissance optimale des cellules pendant la période d'expression et le clonage de cellules, tant mutantes que non mutantes. Pour les essais MLA et sur TK6, il importe également que les conditions de culture garantissent une croissance optimale tant pour les mutants *TK* en grandes colonies/apparaissant précocement que ceux en petites colonies/apparaissant tardivement. De plus amples détails sur les cultures, notamment le besoin de chauffer de manière adéquate le sérum de cheval pour l'inactiver si un milieu RPMI est utilisé lors de la sélection des mutants, sont disponibles dans la littérature (19) (31) (38) (39) (40) (42).

Préparation des cultures

18. Les cellules sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans un milieu de culture à une densité telle que les cultures en suspension poursuivront leur croissance de manière exponentielle tout au long du traitement et des périodes d'expression.

Activation métabolique

19. Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules L5178Y et TK6 dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé, recommandé par défaut, sauf justification contraire, est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foies de rongeurs (généralement des rats) traités avec des inducteurs enzymatiques comme l'Aroclor 1254 (43) (44) (45) ou une association de phénobarbital et de β -naphthoflavone (46) (47) (48) (49) (50) (51). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (52) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Arcolor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (45) (46) (47) (48) (49). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 2 % mais qui peut être portée à 10 % (v/v) dans le milieu d'essai final. 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 produits chimiques à tester.

Préparation du produit chimique d'essai

20. Les produits chimiques solides à tester sont dissous dans un solvant approprié puis, le cas échéant, dilués avant application (voir paragraphe 21). Avant le traitement, les produits chimiques liquides peuvent être ajoutés directement et/ou après dilution au système d'essai. Les produits gazeux ou volatils nécessitent une modification appropriée des protocoles standards, par exemple l'utilisation de récipients de culture hermétiquement clos (53) (54) (55). 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 expérimentales

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, c'est-à-dire sans modifier la croissance cellulaire, nuire à l'intégrité du produit chimique d'essai, réagir avec les récipients de culture ou détériorer le système d'activation métabolique. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant (ou milieu de culture) aqueux chaque fois que cela est possible. L'eau et le diméthylsulfoxyde sont des exemples de solvants couramment utilisés. En règle générale, les solvants organiques ne doivent pas

dépasser 1 % (v/v) et les solvants aqueux (salin ou eau) 10 % (v/v) dans le milieu de traitement final. L'emploi d'un solvant 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 les définitions à l'[annexe 1](#)) afin de démontrer que le solvant choisi n'entraîne aucun effet délétère ou mutagène.

Mesure de la cytotoxicité cellulaire et choix des concentrations du traitement

22. Lors de la détermination de la plus forte concentration du produit chimique d'essai à tester, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 28), une précipitation (voir paragraphe 29) dans le milieu de culture, ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (voir paragraphe 8). 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.

23. La concentration est sélectionnée en fonction de la cytotoxicité et d'autres considérations (voir paragraphes 27 à 30). 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. Même si une évaluation initiale de la cytotoxicité a été effectuée, il reste indispensable de mesurer la cytotoxicité pour chaque culture dans le cadre de l'expérience principale. Si une expérience est menée pour déterminer les concentrations à utiliser, elle doit couvrir une large gamme de concentrations et doit soit être achevée au Jour 1 après le traitement, soit être menée jusqu'à l'expression du Jour 2 et la sélection des mutants (s'il apparaît que les concentrations utilisées sont appropriées).

24. La cytotoxicité doit être déterminée pour chaque culture d'essai individuelle et chaque culture témoin : les méthodes à employer pour l'essai MLA (2) et l'essai sur TK6 (15) sont définies par la pratique internationalement reconnue.

25. Pour les deux versions de l'essai MLA, avec gélose et avec micropuits, la cytotoxicité est évaluée en utilisant la croissance relative totale (CRT), initialement définie par Clive et Spector en 1975 (2). Cette mesure comprend la croissance relative en suspension (CRS : culture d'essai par rapport au témoin avec solvant) durant le traitement cellulaire, le délai d'expression et l'efficacité de clonage relative (ECR : culture d'essai par rapport au témoin avec solvant) lorsque les mutants sont sélectionnés (2) Il convient de noter que la CRS inclut toute perte cellulaire se produisant dans la culture d'essai durant le traitement (voir les formules à l'[annexe 2](#)).

26. Pour l'essai sur TK6, la cytotoxicité est évaluée au regard de la survie relative (SR), à savoir l'efficacité de clonage des cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement, ajustée en fonction d'éventuelles pertes cellulaires en cours de traitement, en fonction du nombre de cellules comparativement au témoin négatif (à qui l'on a attribué une survie de 100 %) (voir les formules à l'[annexe 2](#)).

27. Il convient d'évaluer au moins quatre concentrations d'essai (sans compter les témoins avec solvant et les témoins positifs) remplissant les critères d'acceptabilité (cytotoxicité appropriée, nombre de cellules, etc.). Alors que l'utilisation de cultures en double exemplaire est recommandée, chacune des cultures réalisées en un seul ou plusieurs exemplaires peut être utilisée à chaque concentration d'essai. Les résultats obtenus pour chacune des répliques à une concentration donnée doivent faire l'objet de rapports distincts mais peuvent être regroupés pour l'analyse des données (55). Pour les produits chimiques dont la

cytotoxicité est faible ou nulle, des niveaux de concentrations espacés d'un facteur de 2 à 3 environ conviendront généralement. En cas de cytotoxicité, les concentrations d'essai retenues doivent couvrir une plage englobant la concentration produisant une cytotoxicité telle que décrite au paragraphe 28 et les concentrations pour lesquelles une cytotoxicité modérée, faible ou nulle est observée. De nombreux produits chimiques d'essai présentent des courbes concentration-réponse à forte pente et, afin de couvrir toute la plage de valeurs de la cytotoxicité ou pour étudier en détail la réponse à la concentration, il pourra s'avérer nécessaire d'utiliser des concentrations plus rapprochées et plus de quatre concentrations, notamment dans les cas où il est nécessaire de répéter l'expérience (voir paragraphe 70). Si l'on réalise des cultures en un seul exemplaire, il peut être particulièrement important d'utiliser plus de 4 concentrations.

28. Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une CRT comprise entre 20 et 10 % pour l'essai MLA, et une SR comprise entre 20 et 10 % pour l'essai sur TK6 (paragraphe 67).

29. 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. Les essais MLA et sur TK6 utilisant des cultures en suspension, il convient de s'assurer particulièrement que ce dernier n'interfère pas avec la conduite de l'essai. Il peut être utile de déterminer la solubilité dans le milieu de culture préalablement à l'essai.

30. 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 (57) (58). Lorsque la composition du produit chimique testé 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 [c'est-à-dire, substances chimiques de composition inconnue ou variable (UVCB)], 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 (59).

Témoins

31. 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 pour chaque condition expérimentale.

32. Des témoins positifs concomitants sont nécessaires pour démontrer la capacité du laboratoire d'identifier les mutagènes dans les conditions du protocole d'essai utilisé, ainsi que l'efficacité du système d'activation métabolique exogène (le cas échéant), et pour démontrer la détection adéquate de mutants *TK* en petites colonies/apparaissant tardivement et en grandes colonies/apparaissant précocement. Le tableau 1 ci-dessous présente des exemples de témoins positifs. D'autres substances chimiques peuvent être utilisées comme témoins positifs, si cela est justifié. 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 (de 3 à 4 heures) effectués avec et sans activation métabolique pendant la même durée de traitement, l'utilisation de témoins positifs peut être limitée à un mutagène nécessitant une activation métabolique.

Dans ce cas, cette seule réponse dans un témoin positif démontrera à la fois l'activité du système d'activation métabolique et la réactivité du système d'essai. En cas de traitement de longue durée (c'est-à-dire, 24 heures sans S9), celui-ci doit toutefois disposer de son propre témoin positif, étant donné que la durée du traitement sera différente de celle de l'essai ayant recours à une activation métabolique. Chaque témoin positif doit être utilisé à une ou plusieurs concentrations devant normalement donner lieu à une augmentation reproductible et détectable par rapport à la valeur de fond afin de démontrer la sensibilité du système d'essai, et la réponse ne doit pas être compromise par une cytotoxicité supérieure aux limites fixées dans la présente Ligne directrice (voir paragraphe 28).

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

Catégorie	Substance	N° CAS
1. Mutagènes actifs sans activation métabolique		
	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3
	Mitomycine C	50-07-7
	N-oxyde de nitro-4 quinoline	56-57-5
2. Mutagènes nécessitant une activation métabolique		
	Benzo(a)pyrène	50-32-8
	Cyclophosphamide (monohydraté)	50-18-0 (6055-19-2)
	Diméthyl-7,12 benzanthracène	57-97-6
	3-Méthylcholanthrène	56-49-5

MODE OPÉRATOIRE

Traitement avec le produit chimique d'essai

33. Les cellules en prolifération sont traitées avec le produit chimique d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique. La durée d'exposition doit être suffisante (de 3 à 4 heures sont généralement efficaces). Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (59). Pour l'essai MLA, dans les cas où le traitement à court terme donne des résultats négatifs, et si les informations présentes suggèrent la nécessité d'un traitement plus long [par ex., analogues nucléosidiques, substances faiblement solubles, (5) (59)], il convient d'envisager un traitement plus long, c'est-à-dire, de 24 heures sans S9.

34. Le nombre minimal de cellules utilisées pour chaque culture (témoin et traitée) d'essai à chaque étape de l'essai doit être basé sur la fréquence de mutants spontanés. Il est conseillé en général de traiter et repiquer suffisamment de cellules dans chaque culture expérimentale pour préserver au moins 10, mais dans l'idéal 100, mutants spontanés à toutes les phases de l'essai (traitement, expression phénotypique et sélection des mutants) (56).

35. Pour l'essai MLA, la fréquence de mutants spontanés acceptable recommandée se situe entre 35 et 140×10^{-6} (version avec diffusion en gélose) et entre 50 et 170×10^{-6} (version avec micropuits) (voir le tableau 2). Pour avoir au moins 10, et dans l'idéal 100, mutants spontanés survivant au traitement pour chaque culture d'essai, il est nécessaire de traiter au moins 6×10^6 cellules. Le traitement de ce nombre de cellules, et la préservation de suffisamment de cellules durant l'expression et le clonage pour la sélection des mutants, permet d'obtenir un nombre suffisant de mutants spontanés (10 ou plus) durant toutes les phases de l'expérience, même pour les cultures traitées à des concentrations qui résultent en une cytotoxicité de 90 % (mesurée par une CRT de 10 %) (19) (38) (39).

36. Pour l'essai sur TK6, la fréquence de mutants spontanés se situe généralement entre 2 et 10×10^{-6} . Pour qu'au moins 10 mutants spontanés survivent au traitement pour chaque culture d'essai, il est nécessaire de traiter au moins 20×10^6 cellules. Le traitement de ce nombre de cellules permet d'obtenir un nombre suffisant de mutants spontanés (10 ou plus), même pour les cultures traitées à des concentrations

causant une cytotoxicité de 90 % pendant le traitement (SR de 10 %). Il faut en outre qu'un nombre suffisant de cellules soient cultivées durant la période d'expression et étalées sur plaque pour la sélection des mutants (60).

Délai d'expression phénotypique et mesure de la cytotoxicité et de la fréquence des mutants

37. À l'issue de la période de traitement, les cellules sont cultivées pendant une période de temps définie de façon à permettre l'expression phénotypique quasi-optimale de mutants nouvellement induits ; cette période est spécifique à chaque lignée cellulaire. Pour l'essai MLA, la période d'expression phénotypique est de 2 jours. Pour l'essai sur TK6, la période d'expression phénotypique est de 3 à 4 jours. Dans le cas d'un traitement de 24 heures, la période d'expression commence après la fin du traitement.

38. Durant la période d'expression phénotypique, les cellules sont dénombrées quotidiennement. Pour l'essai MLA, on utilise les nombres de cellules quotidiens pour calculer la croissance en suspension (CS) quotidienne. Suite à la période d'expression de 2 jours, les cellules sont suspendues dans le milieu avec ou sans agent sélectif afin de déterminer le nombre de mutants (plaques de sélection) et l'efficacité de clonage (plaques de viabilité), respectivement. Pour cet essai, il existe deux méthodes également acceptables pour le clonage de sélection de mutants : le procédé de diffusion en gélose molle et le procédé en milieu liquide dans des plaques de 96 puits (19) (38) (39). Le clonage dans l'essai sur TK6 s'effectue en utilisant des milieux liquides et des plaques à 96 puits (16).

39. La trifluorothymidine (TFT) est le seul agent sélectif recommandé pour les mutants *TK* (61).

40. Pour l'essai MLA, les plaques de gélose et les plaques micropuits sont comptées après 10 à 12 jours d'incubation. Pour l'essai sur TK6, les colonies contenues dans les plaques micropuits sont évaluées après 10 à 14 jours pour l'identification de mutants apparaissant précocement. Afin de récupérer les mutants TK6 à croissance lente (apparaissant tardivement), il est nécessaire de réalimenter les cellules avec du milieu de croissance et de la TFT après avoir compté les mutants apparaissant précocement, puis d'incuber les plaques pendant 7 à 10 jours supplémentaires (62). Voir aux paragraphes 42 et 44 la discussion concernant le dénombrement des mutants *TK* à croissance lente et à croissance normale.

41. On trouvera à l'[annexe 2](#) les calculs à effectuer pour les deux essais et les deux versions (diffusion en gélose et micropuits) de l'essai MLA. Pour la méthode de diffusion en gélose utilisée dans l'essai MLA, les colonies sont comptées et le nombre de colonies mutantes est ajusté en fonction de l'efficacité de clonage afin de calculer une fréquence des mutants. Pour la version utilisant les micropuits dans l'essai MLA et dans l'essai sur TK6, l'efficacité de clonage pour la sélection et les plaques d'efficacité de clonage est déterminée selon la distribution de Poisson (63). La fréquence des mutants est calculée à partir de ces deux efficacités de clonage.

Caractérisation des colonies de mutants

42. Pour l'essai MLA, si le produit chimique testé est positif (voir paragraphes 62 et 63), la caractérisation des colonies en fonction de leur taille ou de leur croissance doit être réalisée sur au moins une des cultures de traitement (généralement exposée à la concentration acceptable donnant la réponse la plus fortement positive) et sur les témoins négatifs et positifs. Si le produit chimique testé est négatif (voir paragraphe 64), la caractérisation des colonies mutantes doit être réalisée sur les témoins négatifs et positifs. Pour la méthode des micropuits de l'essai MLA, les mutants en petites colonies sont ceux qui couvrent moins de 25 % du diamètre du puits et les mutants en grandes colonies sont ceux qui couvrent plus de 25 % du diamètre du puits. Pour la méthode de la diffusion en gélose, un compteur de colonies automatique est utilisé pour dénombrer les colonies mutantes et déterminer la taille des colonies. Les

méthodes à suivre pour déterminer la taille des colonies sont décrites de manière détaillée dans la littérature (19) (38) (40). Il est nécessaire de caractériser les colonies dans les témoins négatifs et positifs afin de démontrer que les études sont menées de manière appropriée.

43. Le produit chimique testé ne peut pas être déterminé comme étant négatif si les mutants en petites et en grandes colonies ne sont pas adéquatement détectés dans les témoins positifs. La caractérisation des colonies peut être utilisée pour fournir des informations d'ordre général concernant la capacité du produit chimique testé de causer des mutations ponctuelles et/ou des événements chromosomiques (paragraphe 4).

44. TK6 : Les mutants à la croissance normale et à la croissance lente sont différenciés en fonction de la différence de temps d'incubation (voir paragraphe 40). Pour l'essai sur TK6, les mutants apparaissant précocement, ainsi que ceux apparaissant tardivement, sont évalués pour l'ensemble des cultures, y compris les témoins négatifs et positifs. Il est nécessaire de caractériser les colonies pour les témoins négatifs et positifs afin de démontrer que les études sont menées de manière appropriée. Le produit chimique testé ne peut pas être déterminé comme étant négatif si les mutants apparaissant précocement ainsi que ceux apparaissant tardivement ne sont pas adéquatement détectés dans le témoin positif. La caractérisation des colonies peut être utilisée pour fournir des informations d'ordre général concernant la capacité du produit chimique testé de causer des mutations ponctuelles et/ou des événements chromosomiques (paragraphe 4).

Compétence du laboratoire

45. 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 une avec activation métabolique et une sans activation métabolique, sélectionnées 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 47 à 50. Pour l'essai MLA, les valeurs obtenues pour les témoins positifs et négatifs doivent être cohérentes avec les recommandations de l'IWGT (voir tableau 2).

46. 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 (si l'on utilise des traitements 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 des substances mutagènes, de déterminer l'efficacité du système d'activation métabolique et de prouver l'adéquation des conditions de croissance cellulaire durant le traitement, l'expression phénotypique et la sélection des mutants, ainsi que l'adéquation des procédures d'évaluation. Il conviendra de définir une plage de concentrations des substances chimiques sélectionnées qui permette d'obtenir des augmentations reproductibles et liées à la concentration par rapport aux valeurs de fond, afin de démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai.

Données des témoins historiques

47. Le laboratoire doit établir :
- une plage et une distribution des témoins positifs historiques,
 - une plage et une distribution des témoins négatifs (non traités, avec solvant) historiques.

48. 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. 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 (64) (65).

49. La base des données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit à l'origine être constituée à partir d'au moins 10 expériences, sachant qu'il serait préférable qu'elle en compte au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques [cartes C ou cartes X-barre, par exemple (65)] afin de déterminer la variabilité de leurs données de témoins positifs et négatifs et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie (66). D'autres détails et recommandations sur la façon de regrouper et d'utiliser des données historiques sont fournis dans la littérature (64).

50. Les données des témoins négatifs désignent la fréquence des mutants issus de cultures réalisées en un seul exemplaire, ou de préférence de cultures répliquées, comme décrit au paragraphe 27. 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. 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 49) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou d'erreur humaine.

51. 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.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Présentation des résultats

52. La présentation de données pour les essais sur cellules de lymphome de souris (MLA) et sur TK6 comprendra, pour les cultures traitées et témoins, les données requises pour le calcul de la cytotoxicité (CRT ou SR, respectivement) et les fréquences des mutants, comme décrit ci-dessous.

53. Pour l'essai MLA, les données seront présentées séparément pour chaque culture en ce qui concerne la CRS, la CRT, l'efficacité de clonage au moment de la sélection des mutants et le nombre de colonies de mutants (pour la version utilisant la diffusion en gélose) ou le nombre de puits vides (pour la version utilisant les micropuits). La fréquence des mutants sera exprimée par le nombre de cellules mutantes par million de cellules survivantes. Si la réponse est positive, les fréquences des mutants en petites et grandes colonies (et/ou le pourcentage de la fréquence des mutants totale) seront données pour au moins une concentration du produit chimique testé (en général la concentration positive la plus élevée) et les témoins positifs et négatifs. En cas de réponse négative, la fréquence des mutants en petite et en grande colonie doit être donnée pour le témoin négatif et pour le témoin positif.

54. Pour l'essai sur TK6, les données seront présentées séparément pour chaque culture en ce qui concerne la SR, l'efficacité de clonage au moment de la sélection de mutants et le nombre de puits vides pour les mutants apparaissant précocement et ceux apparaissant tardivement. La fréquence des mutants sera exprimée comme le nombre de cellules mutantes divisé par le nombre des cellules survivantes, et

inclura la fréquence des mutants totale ainsi que la fréquence des mutants (et/ou le pourcentage de la fréquence des mutants totale) correspondant aux mutants apparaissant précocement ou tardivement.

Critères d'acceptabilité

55. Pour les essais MLA et sur TK6, il convient de veiller à ce que les critères suivants soient remplis avant de déterminer les résultats globaux pour un produit chimique d'essai spécifique :

- Deux conditions expérimentales (traitement de courte durée avec et sans activation métabolique — voir paragraphe 33) ont été testées, à moins que l'une d'entre elles ait abouti à des résultats positifs.
- Un nombre adéquat de cellules et de concentrations sont analysables (paragraphe 27 et 34 à 36).
- Les critères de sélection de la concentration maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 28 à 30.

Critères d'acceptabilité pour les témoins négatifs et positifs

56. L'analyse effectuée par le groupe d'experts sur les cellules de lymphome de souris de l'IWGT portant sur une grande quantité de données provenant de l'essai MLA a donné lieu à un consensus international sur des critères d'acceptabilité spécifiques de l'essai MLA (1) (2) (3) (4) (5). C'est pourquoi la présente Ligne directrice fournit des recommandations spécifiques pour la détermination de l'acceptabilité des témoins positifs et négatifs et pour l'évaluation des résultats d'une substance individuelle dans le cadre d'un essai MLA. La base de données relative à l'essai sur TK6 est beaucoup plus restreinte et n'a pas été évaluée par un groupe de travail.

57. Pour l'essai MLA, chaque expérience doit être évaluée afin de déterminer si le témoin non traité/avec solvant satisfait aux critères d'acceptabilité du groupe de travail MLA de l'IWGT ((4) et le tableau 2 ci-dessous) en ce qui concerne : (1) la fréquence des mutants (FM) (il est à noter que les FM acceptables selon l'IWGT sont différentes pour les versions utilisant la diffusion en gélose et celles utilisant des micropuits), (2) l'efficacité de clonage (EC) au moment de la sélection des mutants et (3) la croissance en suspension (CS) pour le témoin avec solvant (voir les formules à l'[annexe 2](#)).

Tableau 2 : Critères d'acceptabilité pour l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA)

Paramètre	Méthode gélose molle	Méthode micropuits
Fréquence des mutants	35 à 140 X 10 ⁻⁶	50 à 170 X 10 ⁻⁶
Efficacité de clonage	65 à 120 %	65 à 120 %
Croissance en suspension	8 à 32 fois (3 à 4 heures de traitement) 32 à 180 fois (24 heures de traitement, si effectué)	8 à 32 fois (3 à 4 heures de traitement) 32 à 180 fois (24 heures de traitement, si effectué)

58. Pour l'essai MLA, chaque test doit également être évalué pour déterminer si le ou les témoins positifs satisfont à au moins un des deux critères d'acceptabilité suivants définis par le groupe de travail de l'IWGT :

- (1) Le témoin positif démontre une augmentation absolue de la fréquence des mutants totale, c'est-à-dire, une augmentation supérieure à la fréquence des mutants spontanée de fond [une fréquence des mutants induite (FMI) d'au moins 300 X 10⁻⁶]. Au moins 40 % de la FMI doit correspondre à la fréquence des mutants en petite colonie.

(2) Le témoin positif présente une augmentation de la fréquence des mutants en petite colonie d'au moins 150×10^{-6} supérieure à celle observée dans le témoin concomitant non traité/avec solvant (une FMI en petite colonie de 150×10^{-6}).

59. Pour l'essai sur TK6, un essai sera acceptable si les données relatives au témoin négatif concomitant sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins négatifs historiques du laboratoire (voir paragraphes 48 à 49). En outre, les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 32) doivent induire des réponses compatibles avec celles générées dans la base de données des témoins positifs historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants.

60. Pour les deux essais, la limite supérieure de cytotoxicité observée dans la culture du témoin positif doit être la même que celle des cultures expérimentales. En d'autres termes, les CRT/SR ne doivent pas être inférieures à 10 %. Il est suffisant d'utiliser une seule concentration (ou une des concentrations des cultures de témoins positifs si plus d'une concentration est utilisée) pour démontrer que les critères d'acceptabilité pour le témoin positif sont respectés. De plus, la fréquence des mutants du témoin positif doit figurer dans la plage acceptable des valeurs établies pour le laboratoire.

Évaluation et interprétation des résultats

61. Pour l'essai MLA, le groupe d'experts sur les cellules de lymphome de souris de l'IWGT a consacré d'importants travaux à la pertinence biologique et aux critères d'une réponse positive par (4). C'est pourquoi la présente Ligne directrice fournit des recommandations spécifiques pour l'interprétation des résultats de l'essai MLA concernant le produit chimique d'essai (voir paragraphes 62 à 64). La base de données relative à l'essai sur TK6 est beaucoup plus restreinte et n'a pas été évaluée par un groupe de travail. C'est pourquoi les recommandations concernant l'interprétation des données pour l'essai sur TK6 sont exprimées en termes plus généraux (voir paragraphes 65 et 66). Des recommandations complémentaires s'appliquent aux deux essais (voir paragraphes 67 à 71).

MLA

62. Il est recommandé d'adopter une approche permettant de définir les réponses positives et négatives afin de veiller à ce que l'augmentation de la fréquence des mutants soit biologiquement pertinente. Au lieu d'une analyse statistique généralement utilisée pour d'autres essais, cette approche s'appuie sur l'utilisation d'une fréquence de mutants induite prédéfinie (c'est-à-dire, une augmentation de la fréquence des mutants supérieure à celle du témoin concomitant), désignée sous le nom de Facteur d'évaluation global (FEG), et basée sur l'analyse de la distribution des données de fréquence des mutants du témoin négatif des laboratoires participants (4). Pour la version de l'essai MLA utilisant la méthode de diffusion en gélose, le FEG est de 90×10^{-6} et pour la version de l'essai MLA utilisant la méthode des micropuits, le FEG est de 126×10^{-6} .

63. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 33), l'augmentation de la fréquence des mutants au-delà de la fréquence de fond concomitante excède le FEG, et si cette augmentation est liée à la concentration (par exemple au moyen d'un test de tendance). Le produit chimique testé est alors considéré comme capable d'induire des mutations dans ce système d'essai.

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

paragraphe 33), il n'y a pas de réponse liée à la concentration ou, si l'on observe une augmentation de la fréquence des mutants, celle-ci n'est pas supérieure au FEG. Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des mutations dans ce système d'essai.

TK6

65. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique testé est considéré comme clairement positif si, dans les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 33) :

- a) au moins une des concentrations d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concurrent ;
- b) un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la concentration (voir paragraphe 33) ;
- c) les résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson, voir paragraphe 48).

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des mutations dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (66) (67).

66. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées (voir paragraphe 33) :

- 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 48).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des mutations dans ce système d'essai.

Pour les deux essais MLA et sur TK6 :

67. Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une CRT/SR comprise entre 20 et 10 %. De l'avis général, il faut faire preuve de prudence lors de l'interprétation de résultats positifs uniquement trouvés à une CRT/SR comprise entre 20 et 10 %, et un résultat ne doit être considéré comme positif que si l'augmentation de la fréquence des mutants se produit à une CRT/SR inférieure ou égale à 10 % (si évaluée) (2) (59).

68. Dans certaines circonstances, des informations supplémentaires peuvent aider à déterminer si un produit chimique d'essai n'est pas mutagène lorsqu'aucune culture ne présente une valeur de la CRT à une CRT/SR comprise entre 10 et 20 %. Ces circonstances sont les suivantes : (1) Il n'y a pas de signe de mutagénicité (par exemple, aucune relation dose-réponse, aucune fréquence des mutants supérieure à celles observées dans le témoin négatif concomitant ou les valeurs de fond historiques, etc.) dans une série de points de données situés entre 100 % et 20 % de CRT/RS, et présence d'au moins un point de données entre 20 % et 25 % de CRT/RS. (2) Il n'y a pas de signe de mutagénicité (par exemple, aucune relation dose-réponse, aucune fréquence des mutants supérieure à celles observées dans le témoin négatif concomitant ou les valeurs de fond historiques, etc.) dans une série de points de données situées entre

100 % et 25 % de CRT/RS, et présence d'un point de données négatif légèrement inférieur à 10 % de CRT/RS. Dans ces deux cas, il peut être conclu que le produit chimique d'essai est négatif.

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

70. 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 de répéter l'expérience, éventuellement dans des conditions expérimentales modifiées [espacement des concentrations de façon à pour augmenter la probabilité d'atteindre des points de données dans la plage de valeurs de 10 à 20 % de CRT/SR, autres conditions d'activation métabolique (c'est-à-dire, concentration de S9 ou origine de S9) et durée du traitement, par exemple].

71. Dans de rares cas, même après de nouvelles investigations, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure que les résultats sont positifs ou négatifs. La réponse au produit chimique d'essai devra alors être considérée comme équivoque (et donc potentiellement aussi bien positive que négative).

Rapport d'essai

72. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

Produit chimique d'essai :

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

Substance mono-constituant :

- apparence physique, hydrosolubilité, 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 présent dans le milieu de culture final.

Cellules :

Pour les cultures mères du laboratoire :

- type et source des cellules, et antécédents dans le laboratoire d'essai ;
- caractéristiques du caryotype et/ou nombre modal de chromosomes ;
- méthodes d'entretien des cultures cellulaires ;
- absence de mycoplasmes ;
- temps de doublement des cellules.

Conditions de l'essai :

- 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, degré d'humidité ;
- 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) ;
- concentration (et/ou volume) de solvant et de produit chimique d'essai ajoutée au milieu de culture ;
- température d'incubation ;
- temps d'incubation ;
- durée du traitement ;
- densité des cellules pendant le traitement ;
- type et composition du système d'activation métabolique (source du S9, méthode de préparation du mélange S9, concentration ou volume de mélange S9 et de S9 dans le milieu de culture final, contrôles de la qualité du S9) ;
- substances témoins positives et négatives, concentrations finales pour chacune des conditions de traitement ;
- durée de la période d'expression (avec le nombre de cellules déposées et de repiquages et les programmes de nutrition, le cas échéant) ;
- identité de l'agent sélectif et sa concentration ;
- pour l'essai MLA, la version utilisée (méthode de diffusion en gélose ou micropuits) doit être précisée ;
- critères d'acceptabilité des essais ;
- méthodes utilisées pour dénombrer les cellules viables et les cellules mutantes ;
- méthodes utilisées pour mesurer la cytotoxicité ;
- toute information supplémentaire concernant la cytotoxicité et la méthode utilisée ;
- temps d'incubation après étalement sur une plaque ;
- définition des colonies dont le type et pour la taille sont pris en compte (y compris les critères pour les « petites » et « grandes » colonies, le cas échéant) ;
- critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque ;
- méthodes utilisées pour déterminer le pH et l'osmolalité, si cela a été effectué, et la précipitation, si cela est pertinent.

Résultats :

- nombre de cellules exposées et nombre de cellules repiquées pour chaque culture ;

- paramètres de toxicité (CRT pour l'essai MLA et SR pour l'essai sur TK6) ;
- signes de précipitation et moment de la détermination ;
- nombre de cellules étalées sur plaque dans un milieu sélectif et dans un milieu non sélectif ;
- nombre de colonies dans un milieu non sélectif et nombre de colonies résistantes dans un milieu sélectif, et fréquences de mutants correspondantes ;
- taille des colonies pour les témoins négatifs et positifs et, si le produit chimique est positif, au moins une concentration, et fréquences des mutants correspondantes ;
- relation concentration-réponse, si possible ;
- données relatives aux témoins négatifs (solvants) et positifs (concentrations et solvants) concomitants ;
- données relatives aux témoins négatifs (solvants) et positifs (concentrations et solvants) historiques, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts-types, nombre d'essais sur lesquels les témoins historiques sont basés ;
- analyses statistiques (pour chaque culture et chaque lot de réplicats, le cas échéant), et valeurs p, le cas échéant ; et pour l'essai MLA, évaluation du FEG.

Discussion des résultats.

Conclusion.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. et Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse lymphoma thymidine kinase locus (tk) gene mutation assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.
- 2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. et Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.
- 3) Moore M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. et Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation. Res., 540:127-140.
- 4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. et Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, (2003) – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1):1-5.
- 5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. et Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, (2005), Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.
- 6) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations No. 234, OCDE, Paris.
- 7) Fellows, M.D., Luker, T., Cooper, A. et O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation Res., 746 (1): 21-28.
- 8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. et Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.
- 9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol. Sci.*, 109 (1): 96-105.

- 10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., et Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (1): 51-55.
- 11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. et Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/TK^{+/-} Leads to TK^{-/-} Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, *Mutation Res.*, 84 (1): 169-181.
- 12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. et Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y TK^{+/-} Mutants Early in their Clonal History, *Mutation Res.*, 147 (5): 237-242.
- 13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. et Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151 (1): 161-174.
- 14) Liber, H.L., Call, K.M. et Little, J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 178 (1): 143-153.
- 15) Li, C.Y., Yandell, D.W. et Little, J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 18 (1): 77-87.
- 16) Honma, M., Hayashi, M. et Sofuni, T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. *Mutation Res.*, 374 (1): 89-98.
- 17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. et Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. *Mol. Carcinog.*, 28 (4): 203-14.
- 18) Amundson, S.A. et Liber, H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. *Mutation Res.*, 267 (1): 89-95.
- 19) Schisler, M.R., Moore M.M. et Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y TK^{+/-} - 3.7.2C) Forward Mutation Assay, in Dhawan A. and Bajpayee M. (Eds.) *Protocols in Genotoxicity Assessment*, Springer Protocols, Humana Press. p. 27-50.
- 20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. et Halliwell, B. (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 Res.*, 634 (1-2): 177-183.
- 21) Nessler, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. et Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutagen.* 49 (6): 439-452.
- 22) Brusick, D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. *Environ. Mutagen.*, 8 (6): 879-886.
- 23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. et Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268 (2): 297-305.

- 24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. et Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257: 147-204.
- 25) Wang, J., Heflich, R.H. et Moore, M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. *Mutation Res.* 626 (1-2): 185-190.
- 26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. *Ann. N.Y. Acad Sci*, 76: 673-680.
- 27) Clive, D. et Spector, J.F.S. (1975). Laboratory Procedure for Assessing Specific Locus Mutations at the TK Locus in Cultured L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Mutation. Res.*, 31 (1): 17-29.
- 28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. et Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation. Res.*, 147 (5): 243-253.
- 29) Sawyer, J.R., Moore, M.M. et Hozier, J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Line, *Mutation Res.*, 214 (2): 181-193.
- 30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. et Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y TK^{+/-}-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, *Environ. Mol. Mutagen.*, 47 (2): 127-131.
- 31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. et Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, *Environ. Mol. Mutagen.* 55 (1): 35-42.
- 32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. et DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y TK^{+/-} Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. *Mutation Res.*, 373 (2): 157-165.
- 33) Clark, L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. et Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is Not Responsible for the Small Colony Tymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells, *Mutagen.*, 19 (4): 263-268.
- 34) Skopek, T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. et Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 84 (2): 411-416.
- 35) Honma, M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45 (2-3): 162-176.
- 36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. et Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. *Cancer Res.* 55 (1): 12-15.
- 37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland.(2015).

Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscrit en Préparation).

- 38) Lloyd, M. et Kidd, D. (2012), The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods. Parry and Parry (Eds.), Humana Press. ISBN 978-1-61779-420-9, 35-54.
- 39) Mei, N., Guo, X. et Moore, M.M. (2014), Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. Dans: Yan Z and Caldwell (Eds.). Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods, 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.
- 40) Liber, H.L. et Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid human Lymphoblasts. *Mutation Res.*, 94 (2): 467-485.
- 41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O.W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. et Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, 33 (3): 261-287.
- 42) Moore, M.M. et Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, *Mutation Res.*, 104 (4-5): 287-294.
- 43) Ames, B.N., McCann, J. et Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31 (6): 347-364.
- 44) Maron, D.M. et Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113 (3-4): 173-21
- 45) Natarajan, A.T., Tate, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. et De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37 (1): 83-90.
- 46) Matsuoka, A., Hayashi, M. et Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. *Mutation Res.*, 66 (3): 277-290.
- 47) Ong, T.M., Mukhtar, M., Wolf, C.R. et Zeiger, E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4 (1): 55-65 ICH.
- 48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. et Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7 (3): 175-177.
- 49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. et Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. Dans: de Serres, et al (Eds.). *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

- 50) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M., Jr., Ivett., J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P. et Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312 (3): 241-261.
- 51) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. et Galloway, S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28 (1): 51-59.
- 52) PNUE. (2001). Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants, Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE).
- 53) Krahn, D.F., Barsky, F.C. et McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. Dans: Tice R.R., Costa D.L., Schaich K.M. (Eds.) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
- 54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. et Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environ. Mutagen.*, 5 (6): 795-801.
- 55) Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Arito, H., Fukushima, S. et Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay, *Mutation Res.*, 652 (2): 122-130.
- 56) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. et Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. Dans: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. Ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
- 57) Morita, T., Honma, M. et Morikawa, K. (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. Res.*, 741 (1-2): 32-56.
- 58) Brookmire L., Chen J.J. et Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 54 (1): 36-43.
- 59) US FDA. (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Disponible à l'adresse suivante: [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- 60) Honma, M. et Hayashi, M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus p53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 52 (5): 373-384.
- 61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. et Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient (TK^{-/-}) Mutants from L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.*, 85 (5): 363-378.
- 62) Liber, H.L., Yandell, D.W. et Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. *Mutation. Res.*, 216 (1): 9-17.

- 63) Furth, E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. et Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. *Anal. Biochem.*, 110 (1): 1-8.
- 64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. et Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *MutationRes.*, 723 (2): 87-90.
- 65) Ryan, T.P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. John Wiley and Sons, New York 2nd ed.
- 66) OCDE. (2014). *Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Série sur les Essais et Evaluations, (No. 199.)*, Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- 67) Fleiss J.L., Levin B. et Paik M.C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition*, New York: John Wiley & Sons.

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).

Clastogène : substance ou processus induisant des aberrations chromosomiques structurelles dans des populations cellulaires ou des organismes.

Croissance en suspension (CS) : facteur d'augmentation du nombre de cellules au cours du traitement et des phases d'expression de l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA). On calcule la CS en multipliant le facteur d'augmentation le Jour 1 par le facteur d'augmentation le Jour 2 pour le traitement de courte durée (3 ou 4 heures). Dans le cas d'un traitement sur 24 heures, la CS correspond au facteur d'augmentation durant le traitement de 24 heures multiplié par les facteurs d'augmentation des jours d'expression 1 et 2.

Croissance relative en suspension (CRS) : pour l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA), augmentation relative sur deux jours du nombre total de cellules en suspension dans une culture d'essai comparée à l'augmentation totale sur deux jours du nombre de cellules en suspension dans le témoin négatif/avec solvant (Clive et Spector, 1975). La CRS doit comprendre la croissance relative de la culture d'essai comparée à celle du témoin négatif/avec solvant durant la période de traitement.

Croissance relative totale (CRT) : la CRT est utilisée pour mesurer la toxicité liée au traitement dans l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA). Elle mesure la croissance relative (par rapport au témoin avec véhicule) des cultures d'essai durant les phases de traitement, d'expression sur deux jours et de clonage de sélection des mutants de l'essai. La CRS de chaque culture d'essai est multipliée par l'efficacité de clonage relative de la culture d'essai au moment de la sélection de mutants et exprimée par rapport à l'efficacité de clonage du témoin négatif/avec solvant (Clive et Spector, 1975).

Cytotoxicité : pour les essais visés par la présente Ligne directrice, la cytotoxicité correspond à une baisse de la croissance relative totale (CRT) ou de la survie relative (SR) pour l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA) et l'essai sur TK6, respectivement.

Délai d'expression phénotypique : délai après traitement au bout duquel l'altération génique est fixée dans le génome et tous les produits géniques préexistants sont épuisés au point que le caractère phénotypique est modifié.

Efficacité de clonage : pourcentage de cellules étalées sur plaque à une faible densité qui sont capables de se développer pour former une colonie dénombrable.

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

Fréquence des mutants (FM) : nombre de mutants observés divisé par le nombre de cellules viables.

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

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

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).

Mutagènes décalant le cadre de lecture : substances entraînant l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de bases dans la molécule d'ADN.

Mutagènes provoquant la substitution de paires de bases : substances qui entraînent le remplacement d'une ou de plusieurs paires de bases de l'ADN.

Mutation directe : mutation de gène de la forme parentale en une forme mutante, qui engendre une modification ou une perte de l'activité enzymatique ou de la fonction de la protéine codée.

Recombinaison mitotique : durant la mitose, recombinaison entre chromatides homologues pouvant induire des cassures double brin de l'ADN ou une perte d'hétérozygotie.

Survie relative (SR) : la SR sert à mesurer la cytotoxicité liée au traitement dans l'essai sur TK6. Elle correspond à l'efficacité de clonage relative (ECR) des cellules étalées sur plaques immédiatement après le traitement cellulaire, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement, par rapport à l'efficacité de clonage du témoin négatif.

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

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

ANNEXE 2

FORMULES

Cytotoxicité**Pour les deux versions (gélose et micropuits) de l'essai sur cellules de lymphome de souris (MLA)**

La cytotoxicité est définie par la croissance relative totale (CRT) qui comprend la croissance relative en suspension (CRS) durant la période d'expression de 2 jours et l'efficacité de clonage relative (ECR) obtenue au moment de la sélection de mutants. La CRT, la CRS et l'ECR sont toutes exprimées en pourcentage.

Calcul de la CRS : La croissance en suspension un (CS_1) correspond au taux de croissance entre le Jour 0 et le Jour 1 (concentration cellulaire au Jour 1 / concentration cellulaire au Jour 0) et la croissance en suspension deux (CS_2) correspond au taux de croissance entre le Jour 1 et le Jour 2 (concentration cellulaire au Jour 2 / concentration cellulaire au Jour 1). La CRS correspond à la CS totale ($CS_1 \times CS_2$) pour la culture traitée comparée au témoin non traité/avec solvant. C'est-à-dire : $CRS = [CS_1 \text{ (essai)} \times CS_2 \text{ (essai)}] / [CS_1 \text{ (témoin)} \times CS_2 \text{ (témoin)}]$. La CS_1 doit être calculée à partir de la concentration cellulaire initiale utilisée au début du traitement des cellules. La CRS permet de tenir compte d'une éventuelle cytotoxicité différentielle se manifestant dans la ou les cultures d'essai durant le traitement des cellules.

L'ECR est l'efficacité de clonage relative de la culture d'essai comparée à l'efficacité de clonage relative du témoin non traité/avec solvant obtenue au moment de la sélection des mutants.

Croissance relative totale (CRT) : $CRT = CRS \times ECR$

TK6**Survie relative (SR) :**

La cytotoxicité est évaluée par la survie relative, c'est-à-dire l'efficacité de clonage (EC) des cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement cellulaire, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement, par rapport à l'efficacité de clonage sur les témoins négatifs (à qui l'on attribue une survie de 100 %). L'ajustement pour la perte de cellules durant le traitement peut être calculé de la manière suivante :

$EC \text{ ajustée} = EC \times \frac{\text{nombre de cellules à la fin du traitement}}{\text{nombre de cellules au début du traitement}}$

La SR pour une culture traitée par un produit chimique d'essai est calculée comme suit :

$SR = \frac{EC \text{ ajustée pour la culture traitée}}{EC \text{ ajustée pour le témoin avec solvant}} \times 100$

Fréquence des mutants pour les essais MLA et TK6

La fréquence des mutants (FM) correspond à l'efficacité de clonage de colonies de mutants dans un milieu sélectif (EC_M), ajustée en fonction de l'efficacité de clonage dans un milieu non sélectif mesurée au moment de la sélection des mutants (EC_V). C'est-à-dire, $FM = EC_M/EC_V$. Le calcul de ces deux efficacités de clonage est décrit ci-dessous pour les méthodes avec gélose et avec micropuits.

Version avec diffusion en gélose de l'essai MLA : Dans la version de l'essai MLA utilisant de la gélose molle, le nombre de colonies sur la plaque de sélection des mutants (C_M) et le nombre de colonies sur la plaque non sélectionnée ou servant à déterminer l'efficacité de clonage (nombre viable) (C_V) sont obtenus par comptage direct des clones. Lorsque 600 cellules sont étalées sur les plaques afin de déterminer l'efficacité de clonage (EC), les plaques destinées à la sélection des mutants (EC_M) et les plaques non sélectionnées ou servant à mesurer l'efficacité de clonage (nombre viable) (EC_V) et que 3×10^6 cellules sont utilisées pour la sélection des mutants,

$$EC_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$$

$$EC_V = C_V / 600$$

Version avec micropuits pour les essais MLA et sur TK6 : Dans la version avec micropuits de l'essai MLA, la C_M et la C_V sont déterminées comme étant le produit du nombre total de micropuits (TM) et du nombre probable de colonies par puits (P) sur les plaques micropuits.

$$C_M = P_M \times TM_M$$

$$C_V = P_V \times TM_V$$

À partir du terme zéro de la distribution de Poisson (Furth *et al.*, 1981), on obtient P de la façon suivante :

$$P = - \ln (PV / TM)$$

Où, PV désigne les puits vides et TM le total des puits. Par conséquent,

$$EC_M = C_M / T_M = (P_M \times TM_M) / T_M$$

$$EC_V = C_V / T_V = (P_V \times TM_V) / T_V$$

Pour la version de l'essai MLA utilisant les micropuits, la fréquence des mutants dans les petites colonies et les grandes colonies sera calculée de manière identique, en utilisant le nombre pertinent de puits vides pour les petites et les grandes colonies.

Pour l'essai sur TK6, la fréquence des mutants des petites et des grandes colonies est calculée en fonction des mutants apparaissant précocement et des mutants apparaissant tardivement.