

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

Essais *in vitro* de mutation génique sur cellules de mammifères utilisant les gènes *Hprt* et *xprt*

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 du bien-être des animaux. La Ligne directrice 476 (LD 476) originale a été adoptée en 1984. En 1997, elle a été remplacée par une version révisée sur la base des avancées scientifiques réalisées jusqu'alors. Cette dernière version révisée de la LD 476 reflète les connaissances scientifiques acquises après plus de trente années d'expérience de cet essai et résulte également des évolutions d'une nouvelle ligne directrice, distincte, consacrée aux essais *in vitro* de mutation génétique sur les cellules de mammifères menés en utilisant le gène TK (thymidine kinase). La LD 476 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 (1).

2. L'essai *in vitro* de mutation génétique sur les cellules de mammifères a 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 l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (*Hprt* pour les cellules de rongeur, *HPRT* pour les cellules humaines ; collectivement désignés dans cette Ligne directrice par gène *Hprt* et test HPRT), et le transgène de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (*gpt*) (dénommé test XPRT). Les tests de mutation HPRT et XPRT détectent différents éventails d'effets génétiques. Outre les mutations détectées par le test HPRT (substitutions d'une paire de base par une autre, décalages du cadre de lecture, petites délétions et insertions), l'emplacement autosomique du transgène *gpt* peut permettre de détecter des mutations résultant de délétions importantes et même d'une recombinaison mitotique, qui ne sont pas détectées par le test HPRT parce que le gène *Hprt* est situé sur le chromosome X (2) (3) (4) (5) (6) (7). À l'heure actuelle, le test XPRT est moins utilisé que le test HPRT à des fins réglementaires.

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

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

4. 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*.

5. 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 directe 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 (8) (9) (10) une interaction avec les composants du milieu (11) (12) ou une cytotoxicité excessive (13). Une cytotoxicité supérieure aux plafonds recommandés tels que définis au paragraphe 19 est considérée comme excessive pour le test HPRT.

6. Avant d'utiliser la Ligne directrice sur 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.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. Des cellules mutantes déficientes en Hprt dans le test HPRT ou en xprt dans le test XPRT sont résistantes aux effets cytostatiques de la 6-thioguanine (TG), un analogue de la purine. Les cellules munies de l'enzyme Hprt (dans le test HPRT) ou du Gpt (dans le test XPRT) sont sensibles à la TG, qui entraîne une inhibition du métabolisme et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, des cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TG, tandis que des cellules normales qui contiennent l'enzyme Hprt (test HPRT) ou gpt (test XPRT), ne le peuvent pas.

8. Des cellules en suspension ou en culture monocouche sont exposées au produit chimique d'essai, en présence et en l'absence d'une source exogène d'activation métabolique (voir paragraphe 14), pendant une période appropriée (3-6 heures). Les cellules sont repiquées afin de déterminer la cytotoxicité et de laisser le phénotype s'exprimer avant la sélection des mutants (14) (15) (16) (17). On détermine la cytotoxicité en mesurant la survie relative (SR), à savoir l'efficacité de clonage mesurée immédiatement après le traitement et ajustée pendant le traitement en fonction d'une éventuelle perte cellulaire par rapport au témoin négatif (paragraphe 18 et annexe 2). Les cultures traitées sont maintenues dans un milieu de croissance pendant une période de temps suffisante, caractéristique de chaque type de cellule, afin de permettre une expression phénotypique quasi-optimale des mutations induites (habituellement 7-9 jours minimum). Une fois l'expression phénotypique obtenue, on détermine la fréquence des mutants en ensemençant avec un nombre connu de cellules un milieu contenant l'agent sélectif permettant de détecter les colonies de mutants. Dans un milieu exempt d'agent sélectif, on détermine l'efficacité de clonage (viabilité). Après un temps d'incubation approprié, les colonies sont comptées. On corrige le nombre de colonies de mutants de l'efficacité de clonage au moment de la sélection des mutants pour obtenir la fréquence des mutants.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Cellules

9. Les types de cellules utilisés pour les tests de mutation HPRT et XPRT doivent avoir une sensibilité prouvée aux mutagènes chimiques, une efficacité de clonage élevée, un caryotype stable et une fréquence stable de mutants spontanés. Les cellules les plus fréquemment utilisées pour le test HPRT incluent les lignées CHO, CHL et V79 de cellules de hamster chinois, L5178Y de cellules de lymphome de

souris, et TK6 de cellules humaines lymphoblastoïdes (18) (19). Les cellules AS52 qui dérivent des lignées CHO et contiennent le transgène *gpt* (mais pas le gène *Hprt*) sont utilisées pour le test XPRT (20) (21) ; le test HPRT ne peut pas être réalisé sur des cellules AS52 car le gène *Hprt* en a été supprimé. L'utilisation d'autres lignées cellulaires doit être justifiée et validée.

10. La stabilité du caryotype et l'absence de contamination par des mycoplasmes sont vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires (22) (23), et les cellules sont écartées si une contamination ou une modification du caryotype est constatée. La durée normale du cycle cellulaire utilisée dans le laboratoire d'essai doit être établie et doit correspondre aux caractéristiques cellulaires publiées. Il convient également de contrôler la fréquence de mutants spontanés dans le stock de cellules maitresses, et ce stock ne devra pas être utilisé si la fréquence de mutants n'est pas acceptable.

11. Avant d'employer les cultures dans l'essai, il peut être nécessaire de les débarrasser des cellules mutantes qu'elles contiennent, par exemple en utilisant un milieu de culture HAT pour le test HPRT et MPA pour le test XPRT (5) (24) (voir l'[annexe 1](#)). Les cellules nettoyées peuvent être cryopréservées, puis décongelées pour servir de stocks de travail. Il est possible d'utiliser pour le test le stock de travail tout juste décongelé une fois atteints les temps de doublement normaux. Dans le cas d'un test XPRT, la culture de routine de cellules AS52 doit se faire dans des conditions qui assurent le maintien du transgène *gpt* (20).

Milieu et conditions de culture

12. Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂, et température d'incubation de 37 °C) appropriés pour les 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 l'efficacité optimale du clonage pour les cellules mutantes et non mutantes.

Préparation des cultures

13. Les lignées cellulaires sont multipliées à partir de cultures mères, placées dans un milieu de culture à une densité telle que les cellules en suspension ou en monocouche poursuivront leur croissance de manière exponentielle pendant les périodes de traitement et d'expression (il convient par exemple d'éviter que les cellules qui se multiplient en monocouche arrivent à confluence).

Activation métabolique

14. Le recours à un système d'activation métabolique exogène est nécessaire en cas d'utilisation de cellules dotées d'une capacité métabolique endogène inadéquate. Le système le plus couramment utilisé, recommandé par défaut, sauf justification contraire, est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foies de rongeurs (généralement des rats) traités avec des inducteurs enzymatiques comme l'Aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) ou un mélange de phénobarbital et β-naphthoflavone (29) (30) (31) (32). L'utilisation de ce mélange n'est pas contraire à la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (33) et s'est révélée aussi efficace que celle de l'Arcolor 1254 pour l'induction d'oxydases à fonction mixte (29) (31). La fraction S9 est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 2 % (v/v) mais peut être portée à 10 % v/v dans le milieu d'essai final. Le choix du type et de la concentration du système d'activation métabolique exogène ou de l'inducteur métabolique utilisé pourra dépendre de la classe des substances chimiques à tester (34) (35) (36).

Préparation du produit chimique d'essai

15. Les produits chimiques solides à tester sont dissous dans un solvant approprié puis, le cas échéant, dilués avant application (voir paragraphe 16). 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 (37) (38). 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

16. Le solvant doit être choisi de manière à optimiser la solubilité des produits chimiques d' testés, 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 testé, 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'ajouter dans l'essai des témoins non traités (voir 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 d'exposition

17. Lors de la détermination de la plus forte concentration de produit chimique testé, on évitera les concentrations susceptibles de produire de fausses réponses positives, notamment celles qui engendrent une cytotoxicité excessive (voir paragraphe 20), une précipitation dans le milieu de culture (voir paragraphe 21), ou une modification marquée du pH ou de l'osmolalité (voir paragraphe 5). Si le produit chimique testé 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.

18. La concentration est sélectionnée en fonction de la cytotoxicité et d'autres considérations (voir paragraphes 20-22). 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. La cytotoxicité est évaluée au regard de la survie relative (SR), à savoir l'efficacité de clonage (EC) des cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement et fondée sur le nombre de cellules, par rapport à l'efficacité ajustée du clonage sur les témoins négatifs (à qui l'on a attribué une survie de 100 %) (voir les formules à l'[annexe 2](#)).

19. Il convient d'évaluer au moins quatre concentrations d'essai (sans compter les témoins positifs et les témoins avec solvant) remplissant les critères d'acceptabilité (cytotoxicité appropriée, nombre de cellules, etc.). Alors que l'utilisation de cultures en double exemplaires 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 (cultures réalisées en plusieurs exemplaires) à une concentration donnée doivent faire l'objet de rapports distincts mais peuvent être regroupés pour l'analyse des données (17). 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 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 relation concentration-réponse, 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 43). Si l'on réalise des cultures en un seul exemplaire, il peut être particulièrement important d'utiliser plus de 4 concentrations.

20. Si la concentration maximale est basée sur la cytotoxicité, la concentration la plus forte doit viser une cytotoxicité comprise entre 20 et 10 % SR. Les résultats positifs présents uniquement à une SR inférieure ou égale à 10 % doivent être interprétés avec prudence (paragraphe 43).

21. Pour les produits chimiques testés 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 testé. Même si une cytotoxicité intervient au-delà de la concentration insoluble la plus faible, il est recommandé de tester une seule concentration produisant une turbidité ou un précipité visible, car de fausses réponses pourraient découler de ce précipité. À la concentration produisant un précipité, il convient de s'assurer que ce dernier n'interfère pas avec la conduite de l'essai. Il peut être utile de déterminer la solubilité dans le milieu de culture préalablement à l'essai.

22. Si aucun précipité ou aucune cytotoxicité limitante ne sont observés, la concentration d'essai maximale doit correspondre à la plus basse parmi 10 mM, 2 mg/mL ou 2 µl/mL (39) (40). 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 (substances chimiques UVCB) (41), de produits extraits de l'environnement etc., il peut être nécessaire d'augmenter la concentration maximale (5 mg/mL par exemple), en absence de cytotoxicité suffisante, afin d'accroître la concentration de chacun des composants. Il convient toutefois de noter que ces exigences peuvent être différentes pour les produits pharmaceutiques à usage humain (42).

Témoins

23. Des témoins négatifs concomitants (voir paragraphe 16), 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.

24. 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. 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, les tests appliquant des traitements avec et sans activation métabolique exogène peuvent être

menés en utilisant uniquement un témoin positif exigeant 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. 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 20).

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

| Condition d'activation métabolique | Locus | Substance chimique et N° CAS. |
|---------------------------------------|-------------|--|
| en l'absence d'une activation exogène | <i>Hprt</i> | Méthanesulfonate d'éthyle [n° CAS 62-50-0] Ethylnitrosourée [n° CAS 759-73-9] Oxyde de nitro-4 quinoléine [n° CAS 56-57-5] |
| | <i>XPRT</i> | Streptonigrine [n° CAS 3930-19-6] Mitomycine C [n° CAS 50-07-7] |
| en présence d'une activation exogène | <i>Hprt</i> | Méthyl-3 cholantène [n° CAS 56-49-5] Diméthyl7,12 benzantracène [n° CAS 57-97-6] Benzo[a]pyrène [n° CAS 50-32-8] |
| | <i>XPRT</i> | Benzo[a]pyrène [n° CAS 50-32-8] |

MODE OPÉRATOIRE

Traitement avec le produit chimique testé

25. 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 6 heures sont généralement efficaces).

26. Le nombre minimal de cellules utilisées pour chaque culture d'essai (témoin et traitée) 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 pour préserver 10 mutants spontanés dans chaque culture à toutes les phases de l'essai (17). La fréquence des mutants spontanés varie en général entre 5 et 20×10^{-6} . Avec une fréquence de mutants spontanés de 5×10^{-6} et pour entretenir 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 (10 % de SR), il est nécessaire de traiter au moins 20×10^6 cellules. Il faut en outre qu'un nombre suffisant de cellules (jamais moins de 2 millions) soient cultivées durant la période d'expression et étalées sur plaque pour la sélection des mutants (17).

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

27. À l'issue de la période de traitement, les cellules sont cultivées de façon à permettre l'expression phénotypique de mutants. Un minimum de 7 à 9 jours suffit en général à l'expression phénotypique presque optimale des mutants *Hprt* et *xprt* nouvellement introduits (43) (44). Durant cette période, les cellules sont régulièrement mises en sous-culture pour préserver leur croissance exponentielle. Après l'expression phénotypique, les cellules sont à nouveau étalées sur plaque dans le milieu avec et sans agent sélectif (6-thioguanine) afin de déterminer le nombre de mutants et l'efficacité de clonage au moment de la sélection, respectivement. Cette opération peut se faire avec des boîtes pour cultures monocouche ou avec des plaques micropuits pour cellules en suspension. S'agissant de la sélection des mutants, il convient d'étaler sur des plaques les cellules suivant une densité qui assure la récupération optimale des mutants (en évitant notamment la coopération métabolique) (17). On incube les plaques pendant une durée appropriée à une croissance optimale des colonies (par exemple de 7 à 12 jours), puis on compte les colonies. On corrige le nombre de colonies de mutants par l'efficacité de clonage au moment de la sélection des mutants pour obtenir la fréquence des mutants (voir l'[annexe 2](#) pour les formules).

Compétence du laboratoire

28. 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 (en utilisant 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 30 à 33.

29. Une sélection de substances chimiques utilisées comme témoins positifs (voir tableau 1) doit être testée en l'absence et 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

30. 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.

31. 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 (22). 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 (17) (45) (46).

32. 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 (47)), afin de déterminer la variabilité de leurs données de témoins positifs et négatifs et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie (46). On trouve dans la littérature (45) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

33. Les données des témoins négatifs désignent les fréquences des mutants issus de cultures réalisées en un seul exemplaire, ou de préférence de cultures répliquées, comme décrit au paragraphe 23. 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 (17) (45) (46). 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 ci-dessus) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou d'erreur humaine.

34. 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

35. La présentation des résultats doit inclure toutes les données nécessaires au calcul de la cytotoxicité (exprimée en SR). Les données, tant pour les cultures traitées que témoins, doivent inclure le nombre de cellules à la fin du traitement, le nombre de cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement, et le nombre de colonies (ou de puits sans colonies pour la méthode utilisant des plaques micropuits). Il convient d'exprimer la SR pour chaque culture en pourcentage du témoin concomitant contenant le solvant. (Voir les définitions à l'[annexe 1](#)).

36. La présentation des résultats doit également inclure toutes les données nécessaires au calcul de la fréquence des mutants. Les données, tant pour les cultures traitées que témoins, doivent inclure : (1) le nombre de cellules étalées sur plaque avec et sans agent sélectif (au moment où les cellules sont étalées sur plaque pour la sélection des mutants), et (2) le nombre de colonies (ou le nombre de puits sans colonies pour la méthode utilisant des micropuits) sur les plaques avec et sans agent sélectif. On corrige le nombre de colonies de mutants (sur les plaques avec agent sélectif) par l'efficacité de clonage (sur les plaques sans agent sélectif) pour obtenir la fréquence des mutants. Il convient d'exprimer la fréquence des mutants en nombre de cellules mutantes par million de cellules viables. (Voir les définitions à l'[annexe 1](#)).

37. Les données seront présentées séparément pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Critères d'acceptabilité

38. 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 33).
- Les témoins positifs concomitants (voir paragraphe 24) 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.
- Deux conditions expérimentales (à savoir avec et sans activation métabolique) ont été testées, à moins que l'une d'entre elles ait abouti à des résultats positifs (voir paragraphe 25).
- Un nombre adéquat de cellules et de concentrations sont analysables (voir paragraphes 26, 27 et 19).
- Les critères de sélection de la concentration maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 20, 21 et 22.

Évaluation et interprétation des résultats

39. 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:

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

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des mutations génétiques dans les cellules de mammifères en culture dans ce système d'essai. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (46) (48).

40. 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:

- 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 33).

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

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

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

43. 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

44. 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 ;
- 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 :

- caractérisée, autant que possible par exemple l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence quantitative et les propriétés physico-chimiques pertinentes 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 lignées cellulaires ;

- nombre de repiquages, le cas échéant, et historique au laboratoire ;
- 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 ;
- 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 ;
- critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque ;
- méthodes utilisées pour déterminer le pH, l'osmolalité et la précipitation.

Résultats :

- nombre de cellules exposées et nombre de cellules repiquées pour chaque culture ;
- mesures de la cytotoxicité et autres observations le cas échéant ;
- 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 ;
- relation concentration-réponse, si possible ;
- données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs (concentrations et solvants) concomitants ;
- données relatives aux témoins négatifs (solvant) et positifs historiques, y compris ordres de grandeur, moyennes, écarts-types et intervalle de confiance (par exemple 95 %) et nombre de données ;
- analyses statistiques (pour chaque culture et chaque lot de réplicats, le cas échéant), et valeurs P le cas échéant.

476

OECD/OCDE

Discussion des résultats.

Conclusion.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) 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.
- (2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. et Tindall K.R. (Eds.). (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, ColdSpringHarbor Laboratory, New York, New York.
- (3) Chu E.H.Y. et Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., États-Unis, 61, 1306-1312.
- (4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. et Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagen.*, 4, 394-403.
- (5) Aaron C.S. et Stankowski L.F. Jr. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, 121-128.
- (6) Aaron C.S., Bolesfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. et Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, 235-239.
- (7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. et Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutation Res.*, 196, 17-36.
- (8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., 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.
- (9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. et Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.
- (10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789-886.
- (11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. et Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrotriacetic Acid. *Environ. Mol. Mutation Res.*, 49, 439-452.
- (12) 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, 177-183.

- (13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., et Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. *Mutation Res.*, 584, 1–256.
- (14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O’Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. et Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135-141.
- (15) 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, 9-17.
- (16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. et Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133-147.
- (17) 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. In : Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds), Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O’Neill J.P., et Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 86, 193-214.
- (19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, *Mutation Res.*, 85, 165-175.
- (20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff, R., et Hsie, A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2gpt-Transformed Cells, *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411-1415.
- (21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., et Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. *Proc Natl Acad Sci.*, 83(24): 9616–9620.
- (22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A. et Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscrit en préparation).
- (23) 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, 261-287.
- (24) Rosen M.P., San R.H.C. et Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, *Can. Lett.* 8, 299-305.

- (25) Natarajan A.T., Tates 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, 83-90.
- (26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. et Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, 365-373.
- (27) 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, 347-364.
- (28) Maron D.M. et Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173, 215.
- (29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. et Wolf R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagen.*, 7, 175-177.
- (30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. et Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In : *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. et Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (31) 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, 55-65.
- (32) 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, 51-59.
- (33) PNUE. (2001). Convention de Stockholm sur les Polluants Organiques Persistants, Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE). Disponible à l'adresse suivante : [<http://www.pops.int/.html>].
- (34) Tan E.-L. et Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cy Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT system. *Mutation Res.*, 84, 147-156.
- (35) O'Neill J.P., et al. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Mammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. *Env. Mol. Mutation Res.*, 4, 7-18.
- (36) Li A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. *Env. Mol. Mutation Res.*, 4, 7-18.
- (37) Krahn D.F., Barsky F.C. et McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In : Tice R.R., Costa D.L., Schaich K.M. (Eds) *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.

- (38) 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. *Environmental Mutagenesis*, **5**, 795-801.
- (39) OCDE .(2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *in vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487)..
- (40) 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. Mutation Res.*, **54**, 36-43.
- (41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, [<http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt>].
- (42) USFDA. (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation Ffr Pharmaceuticals Intended for Human Use. Disponible à l'adresse suivante : [<https://www.federalregister.gov/a/2012-13774>].
- (43) O'Neill J.P., et Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-Thioguanine Resistance in Chinese Hamster Ovary Cells (CHO/HGPRT system), *Mutation Res.*, **59**, 109-118.
- (44) Chiewchanwit T., Ma H., el Zein R., Hallberg L. et Au W.W. (1995). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7477042> Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. *Mutation Res.*, **1335**(2):121-8.
- (45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus HJ. et Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, *Mutation Res.*, **723**, 87-90.
- (46) OCDE. (2014), Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines, Série de l'OCDE sur les Essais et Evaluations, (No. 199.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris.
- (47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O. et Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In : *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (48) Fleiss J. L., Levin B. et Paik M. C. (2003). *Statistical Methods for Rates and Proportions*, Troisième Edition, New York : John Wiley & Sons.

ANNEXE 1DÉFINITIONS

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

Cytotoxicité : pour les essais visés par la présente ligne directrice, la cytotoxicité correspond à une baisse de la survie relative des cellules traitées par rapport au témoin négatif (voir paragraphe spécifique).

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 déplétés 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.

Fréquence des mutants (FM) : nombre de colonies de mutants observées divisé par le nombre de cellules étalées sur plaque dans un milieu sélectif, corrigé de l'efficacité (ou viabilité) du clonage au moment de la sélection.

Génotoxique : terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, adduits, remaniements, mutations ou 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.

Milieu HAT : milieu composé d'hypoxanthine, d'aminoptérine et de thymidine, qui sert à nettoyer les mutants Hprt.

Milieu MPA : milieu composé de xanthine, d'adénine, de thymidine, d'aminoptérine et d'acide mycophénolique, qui sert à nettoyer les mutants Xprt.

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 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.

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

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 à un traitement. Elle correspond à l'efficacité de clonage (EC) des cellules étalées sur plaques immédiatement après le traitement, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement, par rapport à l'efficacité de clonage dans les témoins négatifs (à qui l'on attribue une survie de 100 %).

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 d'essai ni solvant) mais préparées parallèlement et de la même façon que les cultures exposées au produit chimique d'essai.

ANNEXE 2FORMULES POUR L'ÉVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ ET DE LA FRÉQUENCE DES MUTANTS

La cytotoxicité est évaluée par la survie relative (SR), c'est-à-dire l'efficacité de clonage (EC) des cellules étalées sur plaque immédiatement après le traitement, ajustée en fonction d'une éventuelle perte de cellules en cours de traitement, par rapport à l'efficacité ajustée du clonage dans les témoins négatifs (à qui l'on attribue une survie de 100 %) (voir la formule de SR ci-après).

L'EC ajustée pour une culture traitée par un produit chimique d'essai est calculée comme suit :

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

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

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

La fréquence des mutants correspond à l'efficacité de clonage de colonies de mutants dans un milieu sélectif divisée par l'efficacité de clonage dans un milieu non sélectif mesurée pour la même culture au moment de sélection.

$$\text{Fréquence des mutants} = \frac{\text{Efficacité de clonage des colonies de mutants dans un milieu sélectif}}{\text{Efficacité de clonage en milieu non sélectif}}$$

Lorsque des plaques sont utilisées pour renforcer l'efficacité de clonage :

$$\text{EC} = \text{Nombre de colonies} / \text{Nombre de cellules étalées sur plaque.}$$

Lorsque des plaques micropuits sont utilisées pour renforcer l'efficacité de clonage :

Le nombre de colonies par puits sur les plaques micropuits obéit à la loi de Poisson.

$$\text{EC} = -\text{Ln}P(0) / \text{Nombre de cellules étalées sur plaque par puits}$$

Où $-\text{Ln} P(0)$ est le nombre probable de puits vides parmi les puitsensemencés et correspond à la formule suivante :

$$\text{Ln}P(0) = -\text{Ln} (\text{nombre de puits vides} / \text{nombre de puitsensemencés})$$