

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

Essai de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur des hépatocytes de mammifères *in vivo*

INTRODUCTION

1. L'essai de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur des hépatocytes de mammifères *in vivo* sert à identifier les substances qui induisent la réparation de l'ADN dans les hépatocytes d'animaux traités. Plusieurs articles généraux sur des essais de synthèse non programmée de l'ADN pratiqués *in vivo* sur des hépatocytes de mammifère ont été publiés (1)(2)(3)(4).
2. Cet essai *in vivo* permet d'étudier la toxicité génétique de produits chimiques dans le foie. L'effet mesuré témoigne de lésions subies par l'ADN et de la réparation qui y fait suite dans les cellules du foie. Le foie constitue généralement le siège principal du métabolisme des composés absorbés. Il se prête donc à la mesure des lésions de l'ADN *in vivo*.
3. Certains termes utilisés sont définis à l'annexe.

CONSIDERATIONS INITIALES

4. Il ne faut pas faire appel au présent test s'il est clairement prouvé que la substance étudiée n'atteindra pas le tissu cible.
5. La synthèse non programmée de l'ADN est mesurée par le taux d'incorporation de nucléosides marqués dans des cellules qui ne se trouvent pas en phase S de synthèse programmée d'ADN. La technique la plus employée consiste à déterminer l'incorporation de la thymidine tritiée ($^3\text{H-TdR}$) par autoradiographie. On préfère utiliser les foies de rat pour les essais UDS *in vivo*. D'autres tissus peuvent être utilisés, mais ils ne sont pas traités dans la présente ligne directrice.
6. La détection d'une réponse UDS est tributaire du nombre de bases de l'ADN excisées et remplacées sur le site de la lésion. Pour cette raison le test UDS est particulièrement précieux pour détecter la réparation de longues séquences (20 à 30 bases, "longpatch repair") due à l'action d'une substance. Par contre, la sensibilité du test est beaucoup plus faible dans la détection de réparations de courtes séquences (1 à 3 bases, "shortpatch repair"). De plus, des événements mutagéniques peuvent intervenir à cause de l'absence de réparation, de mauvaises réparations ou de mauvaises copies de lésions de l'ADN. L'importance de la réponse UDS ne fournit pas d'indication sur la fidélité du processus de réparation. En outre, il est possible qu'un mutagène réagit avec l'ADN et que la lésion n'est pas réparée par un mécanisme d'excision et réparation. Le manque d'informations précises sur l'activité mutagénique qui caractérise l'essai UDS est compensé par sa sensibilité potentielle qui est due au fait que l'effet est mesuré dans l'entièreté du génome.

PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

7. L'essai *in vivo* de synthèse non programmée de l'ADN sur des hépatocytes de mammifères met en évidence la synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un segment d'ADN contenant la région endommagée par l'agent physique ou chimique. L'essai repose sur l'incorporation de ³H-TdR dans l'ADN d'hépatocytes dont une faible proportion se trouve dans la phase S du cycle cellulaire. L'incorporation de ³H-TdR est habituellement mesurée par autoradiographie, étant donné que cette technique est moins sujette à des interférences dues aux cellules en phase S que le comptage à scintillation liquide, par exemple.

DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

Préparations

Sélection des espèces animales

8. Les rats sont communément utilisés, bien que n'importe quelle espèce de mammifère appropriée puisse être employée. Il convient d'utiliser des animaux adultes jeunes et sains issus de souches courantes de laboratoire. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser ± 20 pour cent du poids moyen de chaque sexe.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

9. La température de la salle d'essai doit être de 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). L'humidité relative doit s'élever à au moins 30% et ne pas dépasser 70% de préférence, sauf pendant le nettoyage du local. Une humidité relative de 50 à 60% est idéale. Il convient d'employer un éclairage artificiel avec une alternance de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. Les animaux peuvent être nourris avec des aliments classiques de laboratoire et doivent disposer d'une quantité non limitée d'eau potable. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne intégration de la substance d'essai lorsqu'elle est administrée par cette voie. Les animaux peuvent être encagés individuellement ou par petits groupes du même sexe.

Préparation des animaux

10. De jeunes animaux adultes et sains sont répartis au hasard dans les groupes témoins et de traitement. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effets dus à l'emplacement des cages. Les animaux sont marqués individuellement pour pouvoir être identifiés. Ils sont gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours avant le début de l'essai, afin qu'ils puissent s'acclimater aux conditions du laboratoire.

Substance d'essai / préparation

11. Les substances d'essai solides doivent être dissoutes ou mises en suspension dans des solvants ou véhicules appropriés, puis, le cas échéant, diluées avant d'être affectées au traitement des animaux. Les substances liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il faut utiliser des préparations fraîches sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

Conditions expérimentales**Solvant / Véhicule**

12. Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées ni interagir avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité. On recommande d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible.

Témoins

13. Des témoins positifs et négatifs doivent être inclus en parallèle dans chaque partie de l'essai conduite de façon indépendante. A l'exception du traitement avec la substance à étudier, les animaux témoins doivent être traités de la même manière que les animaux testés.

14. Comme témoins positifs il faut prendre des substances dont on sait qu'elles font la synthèse non programmée de l'ADN à des doses qui donnent un accroissement détectable par rapport à la fréquence de fond. Les témoins positifs qui nécessitent une activation métabolique doivent être utilisés à des doses qui provoquent une réponse modérée (4). Les doses doivent être choisies de façon que les effets soient nets et que l'identité des lames codées ne soit pas évidente pour celui qui les interprète. Parmi les substances à administrer aux témoins positifs il y a :

Temps d'échantillonnage	Substance chimique et N° CAS
Les échantillonnages à brève échéance (2 à 4 heures)	N-nitrosodiméthylamine [n° CAS 62-75-9]
Les échantillonnages à longue échéance (12 à 16 heures)	2-acétylamino fluorène [n° CAS 53-96-3]

D'autres substances appropriées peuvent servir pour les témoins positifs. Le contrôle positif peut être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai.

MODE OPERATOIRE**Nombre et sexe des animaux**

15. Le choix du nombre d'animaux doit tenir compte de la variation biologique naturelle dans l'expression de la réaction. Il doit y avoir au moins 3 animaux analysables par groupe. Lorsqu'il existe des données déjà bien fournies en la matière, il suffit d'utiliser 1 ou 2 animaux dans les groupes témoins négatifs et positifs.

16. Si on dispose de données, obtenues antérieurement avec la même espèce et la même voie d'administration, qui démontrent l'absence de différences substantielles de toxicité entre sexes, il suffit de faire l'essai avec un seul sexe, de préférence avec les mâles. Si l'exposition humaine est spécifique pour un sexe, par exemple dans le cas d'un produit pharmaceutique, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés dans l'essai.

Programme de traitement

17. Les substances à étudier sont généralement administrées en une seule fois.

Niveaux de dose

18. Normalement, on teste au moins à deux niveaux de dose. La dose la plus forte est définie comme étant celle qui produit des signes de toxicité tels que l'on peut s'attendre à ce que des doses plus fortes, administrées suivant le même régime, soient létales. Normalement, la dose faible correspond à 25 à 50% de la dose forte. Les critères d'établissement des doses ne doivent pas forcément être respectés si les substances testées possèdent une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les agents mitogènes) ; ces substances doivent être évaluées au cas par cas. En l'absence de données appropriées, on peut déterminer le niveau de dose le plus élevé en procédant à une étude de détermination de la gamme des doses à utiliser, et ce dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale.

19. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme celle qui donne lieu à certains symptômes de toxicité dans le foie (apparition de noyaux pycnotiques, par exemple).

Essai limite

20. Si un essai pratiqué à un seul niveau de dose d'au moins 2000 mg/kg de poids corporel, avec un seul traitement ou deux traitements le même jour, en appliquant la méthode décrite pour cette étude, n'engendre aucun effet toxique observable et si la toxicité est improbable d'après les données se rapportant aux composés de structure voisine, il n'est peut-être pas nécessaire de réaliser une étude complète. Toutefois, l'exposition humaine prévisible peut conduire à retenir un niveau de dose plus élevé pour l'essai limite.

Administration des doses

21. La substance à étudier est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule adaptée. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles sont justifiées. Cependant, la voie intrapéritonéale n'est pas recommandée car elle pourrait exposer directement le foie à la substance à étudier, plutôt que par l'intermédiaire du système circulatoire. Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal testé. Le volume ne doit pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. L'utilisation de volumes plus importants demande à être justifiée. Il convient de minimiser la variation du volume administré en ajustant la concentration de façon que le volume soit constant à tous les niveaux de dose, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés à des concentrations plus élevées.

Préparation des hépatocytes

22. Normalement, les hépatocytes sont prélevés sur les animaux traités et préparés 12 à 16 heures après l'administration du produit. Habituellement, il est nécessaire de pratiquer un autre échantillonnage plus tôt (en général, 2 à 4 heures après le traitement), à moins que l'on obtienne une réponse positive claire à 12-16 heures. Toutefois, d'autres temps de prélèvement peuvent être choisis lorsque les données toxicocinétiques le justifient.

23. On établit des cultures d'hépatocytes de mammifère à court terme en infusant le foie *in situ* avec de la collagenase et en laissant les hépatocytes fraîchement dissociés adhérer à une surface

adéquate. Les hépatocytes des animaux servant de témoins négatifs doivent avoir une viabilité (5) d'au moins 50%.

Détermination de la synthèse non programmée de l'ADN

24. Des hépatocytes de mammifère fraîchement isolés sont incubés dans un milieu contenant de la ^3H -TdR durant le temps nécessaire, par exemple 3 à 8 heures. A la fin de la période d'incubation, les cellules sont retirées du milieu et peuvent ensuite être incubées dans un milieu renfermant un excès de thymidine non marquée, afin de diminuer la radioactivité non incorporée ("cold chase"). Cette deuxième incubation n'est pas nécessaire si la première incubation a été poursuivie plus longtemps. Les cellules sont ensuite rincées, fixées et séchées. Les lames sont plongées dans une émulsion autoradiographique, exposées dans l'obscurité (par exemple réfrigérées pendant 7-14 jours, développées, colorées et comptées. De deux à trois lames sont préparées à partir de chaque animal.

Analyse

25. Les préparations sur lames doivent contenir un nombre suffisant de cellules à morphologie normale pour permettre une évaluation significative de la synthèse non programmée de l'ADN. Des signes de cytotoxicité patente (exemple : pycnose, taux de marquage radioactif réduit) dans les préparations sont recherchés au microscope.

26. Les lames doivent être codées avant le comptage des grains. On procède normalement à un comptage sur 100 cellules par animal, sur au moins deux lames ; si le nombre de cellules soumises à comptage est inférieur à 100, il faut le justifier. Les noyaux en phase S n'entrent pas en ligne de compte dans la détermination de la synthèse non programmée de l'ADN, mais la proportion des cellules en phase S peut être consignée.

27. La quantité de $^3\text{HTdR}$ incorporée dans le noyau et le cytoplasme des cellules à morphologie normale, mise en évidence par le dépôt des grains d'argent, doit être déterminée par des méthodes appropriées.

28. Les grains sont comptés dans les noyaux (grains nucléaires, GN) et dans des zones cytoplasmiques équivalant à un noyau (grains cytoplasmiques, GC). Les GC sont comptés en examinant la région cytoplasmique la plus fortement radioactive ou en prenant la moyenne de deux ou trois comptages de GC effectués au hasard dans le voisinage du noyau. D'autres façons de compter les grains (par exemple le comptage sur la cellule entière) peuvent être appliquées si elles peuvent être justifiées (6).

RESULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

29. Il faut fournir les données individuelles pour chaque lame et chaque animal. et toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux. Le nombre net de grains nucléaires (NGN) doit être calculé pour chaque cellule, pour chaque animal et pour chaque point d'essai, en soustrayant les GC des GN. La fréquence des cellules en réparation peut aussi être calculée, mais la définition de "cellules en réparation" utilisée doit être étayée par des données sur les témoins négatifs, obtenues parallèlement ou antérieurement à l'essai réel. Les résultats numériques peuvent être évalués par des méthodes statistiques. Si une méthode statistique est utilisée, le choix doit être fait et justifié au moment de la conception de l'étude.

Evaluation et interprétation des résultats

30. Les critères suivants peuvent servir de base pour qu'un résultat soit considéré comme positif :

- (i) le NGN dépasse une valeur préétablie, étayée par des données antérieures obtenues dans le laboratoire ; ou
- (ii) le NGN dépasse de manière significative les valeurs des témoins parallèles.

Les critères suivants peuvent servir de base pour qu'un résultat soit considéré comme négatif :

- (i) le NGN ne dépasse pas le seuil des données antérieures ; ou
- (ii) le NGN ne dépasse pas de manière significative les valeurs des témoins parallèles.

31. L'évaluation des résultats peut reposer sur des critères biologiques tels que la variation entre animaux, la relation dose-réponse et la cytotoxicité. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur de décision.

32. Quoique la plupart des essais donnent des résultats clairement positifs ou négatifs, il arrive, rarement que l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Ces résultats équivoques ou discutables peuvent survenir indépendamment du nombre de fois que l'essai a été répété.

33. Un résultat positif obtenu au cours d'un essai de synthèse non programmée d'ADN pratiqué *in vivo* sur des hépatocytes de mammifère indique qu'une substance induit une lésion de l'ADN des hépatocytes de mammifère *in vivo*, qui peut être réparée par une synthèse non programmée de l'ADN *in vitro*. Un résultat négatif indique que, dans les conditions de l'essai, la substance étudiée n'a pas provoqué de lésions de l'ADN susceptibles d'être détectées par ce test.

34. La possibilité que la substance d'essai ou ses métabolites n'atteignent pas le système circulatoire ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systémique) doit être discutée.

Rapport d'essai

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

Substance d'essai :

- données d'identification et n° CAS, s'il est connu ;
- état physique et pureté ;
- propriétés physico-chimiques qui sont importantes pour la conduite de l'étude ;
- stabilité de la substance d'essai, si elle est connue.

Solvant/véhicule :

- justification du choix du véhicule ;
- solubilité et stabilité de la substance dans le solvant ou véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience :

- espèce et souche utilisées ;
- nombre, âge et sexe des animaux ;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc. ;
- poids individuel des animaux au début de l'essai, y compris la gamme des poids, l'écart moyen et pondéré dans chaque groupe.

Conditions expérimentales :

- données des témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule) ;
- données obtenues dans l'étude d'évaluation de grandeur, si elle a été faite ;
- justification du choix des doses employées ;
- détails concernant la formulation de la substance d'essai ;
- détails concernant l'administration de la substance d'essai ;
- justification du choix de la voie d'administration ;
- méthodes pour vérifier que la substance a atteint le système circulatoire ou le tissu cible, le cas échéant ;
- conversion de la concentration de la substance d'essai (ppm) dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu ;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau ;
- description détaillée des programmes de traitement et de prélèvement ;
- méthodes de détermination de la toxicité ;
- méthodes de préparation et de culture des hépatocytes ;
- technique autoradiographique utilisée ;
- nombre de lames préparées et de cellules soumises au comptage ;
- critères d'évaluation ;
- critères de décision concernant les études positives, négatives et ambiguës.

Résultats :

- nombres comptés de grains nucléaires, grains cytoplasmiques et nombre net de grains nucléaires (valeurs individuelles par lame et par animal, et moyenne par groupe) ;
- relation dose-réponse, si elle est disponible ;
- évaluation statistique, le cas échéant ;
- signes de toxicité ;
- données concernant les essais témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs, réalisés parallèlement ;
- données concernant les essais témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs réalisés antérieurement à l'essai, y compris, par exemple, les ordres de grandeur, les moyennes et les écarts types ;
- nombre de cellules en réparation, s'il a été déterminé ;
- nombre de cellules en phase S, s'il a été déterminé ;
- la viabilité des cellules.

Discussion des résultats.

Conclusion.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Mutation Res.*, 156, 1-18.
- (2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. *Mutation Res.*, 189, 123-133.
- (3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I.de G. (1993). *In Vivo* Rat Liver UDS Assay. In : Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) *Supplementary Mutagenicity Tests : UKEM Recommended Procedures*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
- (4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1994). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. *Mutation Res.*, 312, 263-285.
- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). *Mutation Res.*, 291, 21-27.
- (6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. *Environ. Mutagen*, 4, 553-562.

ANNEXEDEFINITIONS

Cellules en réparation : un nombre net de grains nucléaires (NGN) supérieur à une valeur préétablie étayée par des données existant dans le laboratoire.

Nombre net de grains nucléaires (NGN) : mesure quantitative de la synthèse non programmée de l'ADN dans les cellules par autoradiographie, calculée en déduisant le nombre moyen de grains cytoplasmiques (GC) dans des zones cytoplasmiques équivalant au noyau du nombre de grains nucléaires (NG), donc $NGN = GN - GC$. Le NGN est d'abord calculé pour des cellules individuelles, puis totalisé pour toute une culture, dans des cultures parallèles, etc.

Synthèse non programmée de l'ADN (UDS) : synthèse d'ADN de réparation après excision et élimination d'un segment d'ADN contenant une région endommagée par des agents physiques ou chimiques.