

LOIS, DECRETS, ORDONNANCES ET REGLEMENTS WETTEN, DECRETEN, ORDONNANTIES EN VERORDENINGEN

MINISTERE DES AFFAIRES SOCIALES, DE LA SANTE PUBLIQUE ET DE L'ENVIRONNEMENT

F. 2001 — 2437 [C — 2001/22541]

11 JUILLET 2001. — Arrêté royal modifiant l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement

ALBERT II, Roi des Belges,

A tous, présents et à venir, Salut.

Vu la loi du 21 décembre 1998 relative aux normes de produits ayant pour but la promotion de modes de production et de consommation durables et la protection de l'environnement et de la santé, notamment l'article 5, § 1^{er}, premier alinéa, 3^o et 5^o;

Vu la directive 2000/32/CE de la Commission du 19 mai 2000 portant vingt-sixième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses;

Vu l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement, modifié par les arrêtés royaux des 14 février 1985, 14 septembre 1989, 19 juillet 1994, 13 novembre 1997, 14 décembre 1998, 25 novembre 1999, 4 février 2000 et du 28 septembre 2000 et dont l'annexe VI a été rectifiée par l'arrêté ministériel du 10 octobre 2000;

Vu l'association des Gouvernements de région à l'élaboration du présent arrêté;

Vu l'avis du Conseil Fédéral du Développement durable du 6 février 2001;

Vu l'avis du Conseil supérieur d'Hygiène publique du 18 janvier 2001;

Vu l'avis du Conseil de la Consommation du 18 décembre 2000;

Vu l'avis du Conseil central de l'Economie du 19 janvier 2001;

Vu l'avis de l'Inspecteur des Finances donné le 18 décembre 2000;

Vu l'accord du Ministre du Budget donné le 17 avril 2001;

Vu la délibération du Conseil des Ministres sur la demande d'avis dans un délai d'un mois;

Vu l'avis 31588/3 du Conseil d'Etat, donné le 3 juillet 2001, en application de l'article 84, alinéa 1^{er}, 1^o, des lois sur le Conseil d'Etat, coordonnées le 12 janvier 1973, remplacé par la loi du 4 août 1996;

Sur la proposition de Notre Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,

Nous avons arrêté et arrêtons :

Article 1^{er}. Les annexes de l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement, sont modifiées comme suit :

1^o La partie B, de l'annexe V complétée par l'arrêté royal du 14 septembre 1989 et modifiée par les arrêtés royaux des 13 novembre 1997, 14 décembre 1998 et 4 février 2000 est modifiée comme suit :

- a) Le texte de l'annexe IA du présent arrêté remplace le chapitre B.10.
- b) Le texte de l'annexe IB du présent arrêté remplace le chapitre B.11.
- c) Le texte de l'annexe IC du présent arrêté remplace le chapitre B.12.
- d) Le texte de l'annexe ID du présent arrêté remplace le chapitre B.13 et B.14.

e) Le texte de l'annexe IE du présent arrêté remplace le chapitre B.17.

f) Le texte de l'annexe IF du présent arrêté remplace le chapitre B.23. Le titre du chapitre B.23 figurant dans la note explicative est modifié en conséquence.

g) Le texte de l'annexe IG du présent arrêté est ajouté.

MINISTERIE VAN SOCIALE ZAKEN, VOLKSGEZONDHEID EN LEEFMILIEU

N. 2001 — 2437 [C — 2001/22541]

11 JULI 2001. — Koninklijk besluit tot wijziging van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu

ALBERT II, Koning der Belgen,

Aan allen die nu zijn en hierna wezen zullen, Onze Groet.

Gelet op de wet van 21 december 1998 betreffende de productnormen ter bevordering van duurzame productie- en consumptiepatronen en ter bescherming van het leefmilieu en de volksgezondheid, inzonderheid artikel 5, § 1, eerste lid, 3^o en 5^o;

Gelet op de richtlijn 2000/32/EG van de Commissie van 19 mei 2000 tot zesentwintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van Richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen;

Gelet op het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, gewijzigd bij de koninklijke besluiten van 14 februari 1985, 14 september 1989, 19 juli 1994, 13 november 1997, 14 december 1998, 25 november 1999, 4 februari 2000 en van 28 september 2000 en waarvan bijlage VI gerectificeerd werd door het ministerieel besluit van 10 oktober 2000;

Gelet op de omstandigheid dat de Gewestregeringen bij het ontwerpen van dit besluit betrokken zijn;

Gelet op het advies van de Federale Raad voor Duurzame Ontwikkeling van 6 februari 2001;

Gelet op het advies van de Hoge Gezondheidsraad van 18 januari 2001;

Gelet op het advies van de Raad voor het Verbruik van 18 december 2000;

Gelet op het advies van de Centrale Raad voor het Bedrijfsleven van 19 januari 2001;

Gelet op het advies van de Inspecteur van Financiën van 18 december 2000;

Gelet op het akkoord van de Minister van Begroting gegeven op 17 april 2001;

Gelet op de beraadslaging van de Ministerraad betreffende de adviesaanvraag binnen een termijn van één maand;

Gelet op het advies 31588/3 van de Raad van State, gegeven op 3 juli 2001, met toepassing van artikel 84, eerste lid, 1^o, van de wetten op de Raad van State, gecoördineerd op 12 januari 1973, vervangen door de wet van 4 augustus 1996;

Op de voordracht van Onze Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Hebben Wij besloten en besluiten Wij :

Artikel 1. De bijlagen van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, worden gewijzigd als volgt :

1^o Deel B, van bijlage V aangevuld door het koninklijk besluit van 14 september 1989 en gewijzigd door de koninklijke besluiten van 13 november 1997, 14 december 1998 en 4 februari 2000 wordt gewijzigd als volgt :

- a) De tekst van bijlage IA van dit besluit vervangt hoofdstuk B.10.
- b) De tekst van bijlage IB van dit besluit vervangt hoofdstuk B.11.
- c) De tekst van bijlage IC van dit besluit vervangt hoofdstuk B.12.
- d) De tekst van bijlage ID van dit besluit vervangt hoofdstuk B.13 en B.14.

e) De tekst van bijlage IE van dit besluit vervangt hoofdstuk B.17.

f) De tekst van bijlage IF van dit besluit vervangt hoofdstuk B.23. De titel van hoofdstuk B.23 in de verklarende nota wordt dienovereenkomstig gewijzigd.

g) De tekst van bijlage IG van dit besluit wordt toegevoegd.

2° Le quatrième tiret de l'introduction générale de la partie C de l'annexe V complétée par l'arrêté royal du 14 septembre 1989 et modifiée par les arrêtés royaux des 13 novembre 1997, 14 décembre 1998 et 4 février 2000, est supprimé.

3° L'annexe IX, remplacée par l'arrêté royal du 13 novembre 1997 est modifiée conformément à l'annexe II du présent arrêté.

Art. 2. Notre Ministre qui a l'environnement dans ses attributions est chargée de l'exécution du présent arrêté.

Donné à Bruxelles, le 11 juillet 2001.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation,
de la Santé publique et de l'Environnement,
Mme M. AELVOET

2° Het vierde streepje van de algemene inleiding van het deel C van bijlage V aangevuld door het koninklijk besluit van 14 september 1989 en gewijzigd door de koninklijke besluiten van 13 november 1997, 14 december 1998 en 4 februari 2000, wordt geschrapt.

3° Bijlage IX, vervangen door het koninklijk besluit van 13 november 1997 wordt gewijzigd overeenkomstig bijlage II van dit besluit.

Art. 2. Onze Minister bevoegd voor leefmilieu is belast met de uitvoering van dit besluit.

Gegeven te Brussel, 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken,
Volksgezondheid en Leefmilieu,
Mevr. M. AELVOET

Annexe I A

« B.10. MUTAGENICITE — ESSAI IN VITRO D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 473, Essai d'aberration chromosomique in vitro chez les mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai d'aberration chromosomique in vitro est destiné à détecter les agents qui provoquent des aberrations chromosomiques de structure dans des cellules de mammifère en culture (1) (2) (3). Les aberrations de structure peuvent être de deux types; chromosomiques ou chromatidiennes. La majorité des mutagènes chimiques induisent des aberrations de type chromatidien, mais parfois de type chromosomique. Une augmentation de la fréquence de polyploïdie peut indiquer qu'une substance chimique possède la faculté de provoquer des aberrations du nombre des chromosomes. Cet essai n'est cependant pas conçu pour évaluer les aberrations de nombre et il n'est généralement pas utilisé à cette fin. Les mutations chromosomiques et les événements liés sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et on a de bonnes raisons de penser que les mutations chromosomiques et événements liés, touchant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs des cellules somatiques, jouent un rôle dans l'induction de cancers chez l'homme et chez les animaux de laboratoire.

L'essai d'aberration chromosomique in vitro peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies, des souches cellulaires ou des cultures de cellules primaires. Les cellules utilisées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture, de la stabilité de leur caryotype, du nombre et de la diversité des chromosomes et de la fréquence des aberrations chromosomiques spontanées.

Les essais in vitro requièrent généralement l'utilisation d'une source exogène d'activation métabolique. Ce système d'activation métabolique est incapable de reproduire parfaitement les conditions présentes in vivo chez les mammifères. Il faut éviter absolument d'introduire des conditions qui conduiraient à des résultats positifs ne reflétant pas une mutagénicité intrinsèque et pouvant provenir de modification du pH, de l'osmolalité, ou d'une forte cytotoxicité (4) (5).

Cet essai est utilisé pour le dépistage de substances pouvant être mutagènes et cancérigènes pour les mammifères. Bien que de nombreux composés donnant un résultat positif lors de cet essai soient cancérigènes pour les mammifères, il n'y a pas de corrélation parfaite entre cet essai et la cancérogénicité. La corrélation dépend de la classe chimique mais d'autre part, de plus en plus d'arguments laissent penser qu'il existe des agents cancérigènes que cet essai ne permet pas de détecter parce qu'ils agissent par des mécanismes qui n'impliquent pas des lésions directes de l'ADN.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DEFINITIONS

Aberration de type chromatidien : lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique : lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Endoreduplication : processus dans lequel le noyau, après une phase S de réplication, n'entre pas en mitose mais commence une autre phase S. Il en résulte des chromosomes avec 4, 8, 16, ... chromatides.

Lacune (« gap ») : lésion achromatique plus petite que la largeur d'une chromatide, avec un défaut d'alignement minimal des chromatides.

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

Aberration de nombre : modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

Polypléidie : état multiple du nombre de chromosomes haploïdes (n), autre que la diploïdie (c'est-à-dire 3n, 4n, etc.).

Aberration de structure : modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope au stade de la métaphase et se présentant sous la forme de délétions, de cassures, de modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

1.3. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Des cultures de cellules sont exposées à la substance d'essai avec et sans activation métabolique. Après avoir été exposées à la substance d'essai, les cultures de cellules sont, à intervalles préétablis, traitées par une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple de la colchicine ou du Colcemid®), récoltées et teintées. Les cellules en métaphase sont soumises à un examen microscopique afin de détecter les aberrations chromosomiques.

1.4. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1. Préparations

1.4.1.1. Cellules

Diverses lignées cellulaires, souches cellulaires ou cultures de cellules primaires, y compris des cellules humaines, peuvent être utilisées (par exemple les fibroblastes de hamster chinois, les lymphocytes du sang périphérique de l'homme ou d'autres mammifères).

1.4.1.2. Milieu et conditions de culture

Il convient d'utiliser un milieu de croissance et des conditions d'incubation (récipients de culture, concentration de CO₂, température et degré d'humidité) appropriés pour la croissance cellulaire. La stabilité du nombre modal de chromosomes et l'absence de contamination par des mycoplasmes doivent être vérifiées régulièrement dans les lignées cellulaires établies et les souches cellulaires. En cas de contamination, elles ne doivent pas être utilisées. La durée normale du cycle cellulaire de la lignée cellulaire et les conditions de culture utilisées doivent être connues.

1.4.1.3. Préparation des cultures

Lignées et souches cellulaires établies : les cellules sont multipliées à partir de stocks cellulaires,ensemencées dans un milieu de culture à une densité telle que les cultures ne confluent pas avant la récolte, et incubées à 37°C.

Lymphocytes : du sang complet traité avec un anticoagulant (héparine, par exemple) ou des lymphocytes isolés issus de donneurs sains sont ajoutés à un milieu de culture contenant un mitogène (par exemple la phytohémagglutinine) et sont incubés à 37°C.

1.4.1.4. Activation métabolique

Les cellules doivent être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus couramment utilisé est une fraction postmitochondriale enrichie en cofacteurs (S9), préparée à partir de foie de rongeur traité avec des inducteurs enzymatiques, tels que de l'Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) ou un mélange de phénobarbitone et de β-naphthoflavone (10) (11) (12).

La fraction postmitochondriale est généralement utilisée à des concentrations allant de 1 à 10 % v/v dans le milieu de culture final. Le choix du système d'activation métabolique peut dépendre de la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas il peut être préférable d'utiliser plus d'une concentration de la fraction postmitochondriale.

Plusieurs procédés nouveaux, comme la création par génie génétique de lignées cellulaires exprimant des enzymes activantes spécifiques, sont susceptibles de fournir une activation endogène. Le choix des lignées cellulaires utilisées doit être justifié scientifiquement (par exemple par l'importance de l'isoenzyme du cytochrome P450 pour le métabolisme de la substance d'essai).

1.4.1.5. Substances d'essai/préparation

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant le traitement des cellules. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées directement au système d'essai et/ou diluées avant traitement. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2. Conditions expérimentales

1.4.2.1. Solvant/véhicule

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir chimiquement avec la substance d'essai ni altérer la survie des cellules et l'activité du mélange S9. L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible. Dans le cas d'essais conduits avec des substances instables dans l'eau, on utilisera des solvants organiques exempts d'eau. L'eau peut être enlevée par addition d'un tamis moléculaire.

1.4.2.2. Concentrations d'exposition

La cytotoxicité, la solubilité dans le système d'essai et les modifications de pH et d'osmolalité sont des critères à prendre en considération pour déterminer la dose la plus élevée à utiliser.

La cytotoxicité est mesurée, avec et sans système d'activation métabolique, dans l'expérience principale par un indicateur approprié de l'intégrité et de la croissance cellulaires, tel que le degré de confluence des colonies cellulaires, le nombre de cellules viables ou l'index mitotique. Il peut être utile de déterminer la cytotoxicité et la solubilité lors d'un essai préliminaire.

Il convient d'utiliser au moins trois concentrations analysables. Dans le cas d'une substance cytotoxique, on utilisera des concentrations qui couvrent un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale, ce qui signifie en général des concentrations séparées par un facteur compris entre 2 et $\sqrt{10}$ au maximum. La concentration la plus élevée doit entraîner, au moment de la récolte, une réduction significative (au moins 50 %) du degré de confluence, du nombre de cellules ou de l'index mitotique. Ce dernier varie dans le temps après le traitement et fournit seulement une mesure indirecte des effets cytotoxiques et cytostatiques.

Cependant, l'index mitotique est une mesure acceptable pour des cultures en suspension pour lesquelles d'autres mesures de toxicité peuvent être inconfortables ou irréalisables. Des données sur la cinétique du cycle cellulaire, par exemple le temps de génération moyen (TGM), peuvent fournir des compléments d'information.

Toutefois, le TGM est une moyenne générale qui ne révèle pas toujours l'existence de « sous-populations en retard »; même de faibles augmentations du temps de génération moyen peuvent conduire à un retard très important du moment où le nombre d'aberrations est optimal.

En ce qui concerne les substances relativement non cytotoxiques, la concentration maximale doit être la plus basse des trois concentrations suivantes : 5 µl/ml, 5 mg/ml ou 0,01 M.

Pour les substances relativement insolubles qui ne sont pas toxiques aux concentrations solubles, la dose la plus élevée à tester doit être une concentration supérieure à la limite de solubilité dans le milieu de culture à la fin de la période de traitement. Dans certains cas (par exemple si la toxicité n'apparaît qu'à des concentrations supérieures à la plus faible concentration insoluble), il est recommandé de tester plusieurs concentrations auxquelles une précipitation est visible. Il peut être utile d'évaluer la solubilité au début et à la fin du traitement, celle-ci pouvant varier au cours de l'exposition dans le système d'essai en raison de la présence de cellules, de S9, de sérum, etc. On conclut à l'insolubilité lorsqu'une précipitation est observée à l'œil nu. Le précipité ne doit pas interférer avec l'évaluation des résultats.

1.4.2.3. *Témoins négatifs et positifs*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule), avec et sans activation métabolique, doivent être inclus simultanément dans chaque expérience. En présence d'un système d'activation métabolique, la substance utilisée comme témoin positif doit être celle qui exige l'activation pour donner une réponse mutagène.

On utilise comme témoin positif un clastogène connu à des niveaux d'exposition qui conduisent à un accroissement détectable et reproductible par rapport au bruit de fond, démontrant la sensibilité du système d'essai. Les doses des témoins positifs doivent être choisies de manière que les effets soient nets et que l'identité des lames codées ne soit pas évidente. Quelques exemples de témoins positifs figurent dans le tableau ci-dessous.

Condition d'activation métabolique	Substances	Numéro CAS	Numéro Einecs
En l'absence d'activation métabolique exogène	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3	200-625-0
	Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
	Ethylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
	Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
	N-oxyde de 4-nitroquinoléine	56-57-5	200-281-1
En présence d'activation métabolique exogène	Benzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5
	Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
	Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés. De plus, l'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique sera envisagé, s'ils sont disponibles.

Le solvant ou le véhicule doit être utilisé seul en tant que témoin négatif dans le même milieu de culture, dans les mêmes conditions que la substance d'essai et pour chaque temps de prélèvement. On utilisera également des témoins non traités, à moins que des essais antérieurs n'aient démontré que le solvant/véhicule choisi n'a pas d'effet délétère ou mutagène.

1.4.3. **Mode opératoire**

1.4.3.1. *Traitement avec la substance d'essai*

Les cellules en prolifération sont traitées avec la substance d'essai en présence et en l'absence de système d'activation métabolique. Le traitement des lymphocytes doit débuter environ 48 heures après la stimulation mitogénique.

1.4.3.2. On réalise normalement des cultures dupliquées à chaque niveau de dose.

Des cultures dupliquées sont aussi vivement recommandées pour les témoins négatifs (solvant). Si des essais antérieurs ont démontré que la variation entre cultures dupliquées est minimale (13) (14), l'utilisation d'une seule culture pour chaque concentration peut être envisagée.

Les substances gazeuses ou volatiles doivent être testées en utilisant des méthodes appropriées, par exemple dans des récipients de culture hermétiquement fermés (15) (16).

1.4.3.3. *Récolte des cultures*

Pour la première expérience, les cellules sont exposées à la substance d'essai pendant 3 à 6 heures, en présence et en l'absence d'activation métabolique. On prélève ensuite des échantillons après un temps correspondant à environ 1,5 fois la durée du cycle cellulaire normal après le début du traitement (12). Si l'essai s'avère négatif, que ce soit avec ou sans activation métabolique, on effectue un essai supplémentaire sans activation, le traitement se poursuivant jusqu'au prélèvement d'échantillons après une période équivalente à environ 1,5 fois la durée du cycle cellulaire normal. Certaines substances peuvent être détectées plus facilement en prolongeant le temps de traitement et de prélèvement au-delà de 1,5 fois la durée du cycle cellulaire. Les résultats négatifs obtenus avec activation métabolique demandent à être confirmés cas par cas. Si la confirmation des résultats négatifs n'est pas jugée nécessaire, une justification doit être fournie.

1.4.3.4. *Préparation des chromosomes*

Les cultures de cellules sont traitées avec du Colcemid® ou de la colchicine pendant 1 à 3 heures avant la récolte. Chaque culture est récoltée et traitée séparément en vue de la préparation des chromosomes. Celle-ci consiste en un traitement hypotonique, une fixation et une coloration des cellules.

1.4.3.5. *Analyse*

Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées individuellement avant l'analyse au microscope. Le procédé de fixation provoque souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, ce qui entraîne une perte des chromosomes. Pour cette raison, toutes les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal au nombre modal ± 2 . Pour chaque dose et chaque témoin, il y a lieu d'examiner au moins 200 cellules en métaphase bien étalées et, le cas échéant, réparties de façon égale entre les cultures en double exemplaire. Ce nombre peut être réduit lorsqu'un grand nombre d'aberrations sont observées.

Bien que l'essai soit destiné à détecter les aberrations chromosomiques de structure, il est important de signaler d'éventuels cas de polyploidie et d'endoreduplication.

2. RESULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RESULTATS

L'unité expérimentale étant la cellule, on détermine le pourcentage de cellules présentant une ou plusieurs aberrations de structure. Une liste des différents types d'aberrations chromosomiques de structure doit être établie avec leur nombre et leur fréquence dans les cultures traitées et les cultures témoins. Les lacunes sont enregistrées séparément et rapportées mais ne sont généralement pas incluses dans la fréquence totale des aberrations.

On indiquera aussi les résultats des mesures concomitantes de cytotoxicité pour toutes les cultures traitées et les témoins négatifs dans les principaux essais d'aberration chromosomique.

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

Il n'est pas obligatoire de vérifier une réponse nettement positive. Par contre, les résultats équivoques doivent être clarifiés par un ou des essais supplémentaires, de préférence dans des conditions expérimentales modifiées. La nécessité de confirmer les résultats négatifs est discutée au point 1.4.3.3. Lors des expériences complémentaires, il faut envisager la modification des paramètres de l'étude afin d'élargir l'éventail des conditions évaluées. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'intervalle entre les niveaux de dose et les conditions d'activation métabolique.

2.2. EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement lié à la dose ou un accroissement reproductible du nombre de cellules présentant des aberrations. En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (3) (13) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que la substance d'essai est capable d'inhiber les processus mitotiques et d'induire des aberrations de nombre. Une augmentation du nombre de cellules ayant des chromosomes endoredupliqués peut indiquer que la substance d'essai est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (17) (18).

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans de rares cas l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas de conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai. Des résultats positifs à l'essai d'aberration chromosomique in vitro indiquent que la substance d'essai induit des aberrations chromosomiques de structure dans des cellules somatiques de mammifère en culture. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions expérimentales, la substance d'essai n'induit pas d'aberration chromosomique dans des cellules somatiques de mammifère en culture.

3. RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Solvant/véhicule :

- justification du choix du véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Cellules :

- type et source des cellules,
- données sur le caryotype et raisons du choix du type cellulaire utilisé,
- absence de mycoplasme, le cas échéant,
- données concernant le cycle cellulaire,
- sexe des donneurs de sang, sang complet ou lymphocytes isolés, mitogène utilisé,
- nombre de repiquages, le cas échéant,
- méthodes d'entretien des cultures cellulaires, le cas échéant,
- nombre modal de chromosomes.

Conditions de l'essai :

- identité de l'inhibiteur de la métaphase, sa concentration et la durée d'exposition des cellules,
- justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris des données relatives à la cytotoxicité et aux limites de solubilité, si elles sont disponibles,
- composition du milieu et, le cas échéant, la concentration de CO₂,
- concentration de la substance d'essai,
- volume de véhicule et de substances d'essai ajouté,
- température d'incubation,
- temps d'incubation,
- durée du traitement,
- densité cellulaire au moment de l'ensemencement, si nécessaire,
- type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,
- témoins positifs et négatifs,
- méthodes de préparation des lames,
- critères de dénombrement des aberrations,
- nombre de métaphases analysées,
- méthodes de mesure de la toxicité,
- critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque.

Résultats :

- signes de toxicité (degré de confluence, données sur le cycle cellulaire, comptage des cellules, index mitotique),
- signes de précipitation,
- données sur le pH et l'osmolalité du milieu de traitement, si elles ont été déterminées,
- définition appliquée aux aberrations, y compris les lacunes,
- nombre de cellules présentant des aberrations chromosomiques et type d'aberration, séparément pour chaque culture traitée et culture témoin,
- changements de la ploïdie, le cas échéant,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants,
- données historiques concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs (étendues, moyennes, écarts-types).

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in : Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (2) Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985), The In Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in : Progress in Mutation Research, Vol. 5. Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford. pp. 427-432.
- (3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells : Evaluation of 108 chemicals, *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl. 10), pp. 1-175.
- (4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.
- (5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268, pp. 297-305.
- (6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (8) Natarajan, A. T., Bates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System In Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, pp. 83-90.
- (9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro, *Mutation Res.*, 66, pp. 277-290.
- (10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in : de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Iven, J. L., Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on in In Vitro Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, pp. 241-261.
- (13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays, in : Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, pp. 139-149.
- (15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooley, 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.
- (16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and 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, pp. 795-801.
- (17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.
- (18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 11 juillet 2001.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,

Mme M. AELVOET

Annexe I B

« B.11. MUTAGENICITE — ESSAI IN VIVO D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR MOELLE OSSEUSE DE MAMMIFÈRE

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 475, Essai d'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai in vivo d'aberration chromosomique est destiné à identifier les agents qui provoquent des aberrations chromosomiques de structure dans des cellules de moelle osseuse d'animaux, généralement des rongeurs (1) (2) (3) (4). Les aberrations de structure peuvent être de deux types : chromosomiques ou chromatidiennes. Une augmentation de la fréquence de polyploïdie peut indiquer qu'une substance chimique possède la faculté de provoquer des aberrations du nombre des chromosomes. La majorité des mutagènes chimiques induisent des aberrations de type chromatidien, mais parfois de type chromosomique. Les mutations chromosomiques et les événements liés sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et on a de bonnes raisons de penser que les mutations chromosomiques et événements liés, touchant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs des cellules somatiques, jouent un rôle dans l'induction de cancers chez l'homme et chez les animaux de laboratoire.

Les rongeurs sont couramment utilisés dans cet essai. Cet essai se pratique sur la moelle osseuse parce que c'est un tissu très vascularisé, formé d'une population de cellules au cycle rapide et faciles à prélever et traiter.

D'autres espèces et tissus cibles ne font pas l'objet de cette méthode.

Cet essai d'aberration chromosomique se prête particulièrement bien à l'évaluation du risque mutagène, en ce sens qu'il permet de prendre en compte des facteurs de métabolisme in vivo, de pharmacocinétique et de processus de réparation de l'ADN. Ces facteurs peuvent cependant varier d'un animal à un autre et d'un tissu à un autre. Un essai in vivo est aussi utile pour vérifier un effet mutagène détecté par un essai in vitro.

On n'aura pas recours à cet essai s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DEFINITIONS

Aberration de type chromatidien : lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique : lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Endoreduplication : processus dans lequel le noyau, après une phase S de réplication, n'entre pas en mitose mais commence une autre phase S. Il en résulte des chromosomes avec 4, 8, 16, ... chromatides.

Lacune : lésion achromatique inférieure à la largeur d'une chromatide, avec un défaut d'alignement minimal des chromatides.

Aberration de nombre : modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

Polyploïdie : état multiple du nombre de chromosomes haploïdes (n), autre que la diploïdie (c'est-à-dire 3n, 4n etc.).

Aberration de structure : modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope au stade de la métaphase et se présentant sous la forme de délétions, de cassures, de modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

1.3. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés à la substance d'essai par une voie d'exposition appropriée et sont sacrifiés à des moments appropriés après le traitement. Avant le sacrifice, les animaux sont traités avec une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple de la colchicine ou du Colcemid®). Ensuite, les préparations chromosomiques réalisées à partir des cellules de moelle osseuse sont colorées, et les cellules en métaphase sont examinées en vue de la mise en évidence d'aberrations chromosomiques.

1.4. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1. Préparations

1.4.1.1. Sélection des espèces animales

Bien que le rat, la souris et le hamster chinois soient habituellement utilisés, n'importe quelle espèce de mammifère appropriée peut être utilisée. Il convient d'utiliser des animaux adultes, jeunes et sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Au début de l'étude, la différence pondérale entre les animaux doit être minimale et ne pas dépasser $\pm 20\%$ du poids moyen de chaque sexe.

1.4.1.2. Conditions d'encagement et régime alimentaire

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60 %.

1.4.1.3. Préparation des animaux

Les animaux sont répartis par randomisation entre les groupes témoins et les groupes traités. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement. Les animaux sont identifiés individuellement. Ils sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours.

1.4.1.4. Préparation des doses

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis si nécessaire diluées avant d'être administrées aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2. Conditions expérimentales

1.4.2.1. Solvant/véhicule

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données sur leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible.

1.4.2.2. Témoins

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent être inclus pour chaque sexe et dans chaque essai. Les animaux des groupes témoins doivent être manipulés exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent produire des aberrations chromosomiques de structure in vivo à des niveaux d'exposition supposés provoquer un accroissement détectable par rapport au bruit de fond. Les doses de témoin positif doivent être choisies afin que les effets soient évidents mais que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examineur. Le témoin positif peut être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai et un seul prélèvement d'échantillon peut suffire. L'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'ils sont disponibles. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Substance	Numéro CAS	Numéro Einecs
Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
Ethylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamide Monohydrate de cyclophosphamide	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Triéthylènemélatamine	51-18-3	200-083-5

Lors de chaque prélèvement, il faut inclure un lot d'animaux témoins négatifs traités seulement avec le solvant ou le véhicule et par ailleurs manipulés de la même façon que les groupes traités. Ceci peut être évité si l'on dispose de données acceptables sur la variabilité interindividuelle et la fréquence spontanée de cellules comportant des aberrations chromosomiques provenant de témoins historiques. Dans le cas où un seul prélèvement est effectué pour les témoins négatifs, le premier temps de prélèvement est le plus approprié. En outre, des témoins non traités doivent aussi être inclus, à moins que des données historiques ne démontrent que le solvant/véhicule choisi n'induit aucun effet délétère ou mutagène.

1.5. MODE OPERATOIRE

1.5.1. Nombre et sexe des animaux

Chaque groupe traité et groupe témoin doit comprendre au moins cinq animaux analysables par sexe. Si, au moment de l'étude, on dispose de données historiques sur la même espèce et avec la même voie d'administration démontrant l'absence de différence notable de toxicité entre les sexes, la réalisation de l'essai sur un seul sexe est acceptable. Si l'exposition humaine est spécifique du sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés pour l'essai.

1.5.2. Modalité de traitement

Il est préférable d'administrer la substance d'essai en une seule fois. Elle peut aussi être administrée en doses fractionnées (deux doses le même jour avec un intervalle de quelques heures au maximum) afin que l'administration d'un grand volume soit plus aisée. D'autres modalités de traitement sont acceptables s'ils sont scientifiquement justifiés.

Les échantillons sont prélevés après le traitement à deux moments différents de la même journée. Pour les rongeurs, le premier prélèvement après le traitement est effectué après une période de 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire (généralement de 12 à 18 heures). Étant donné que le temps requis par l'absorption et le métabolisme de la substance d'essai ainsi que l'effet de celle-ci sur la cinétique du cycle cellulaire peuvent influencer sur le moment optimal de détection des aberrations, on recommande d'effectuer un autre prélèvement 24 heures après le premier. Si le traitement s'étend sur plus d'une journée, le prélèvement doit avoir lieu après une période de 1,5 fois la durée normale du cycle cellulaire après la dernière administration.

Avant d'être sacrifiés, les animaux reçoivent une dose appropriée d'une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple du Colcemid® ou de la colchicine) par injection intrapéritonéale. Les prélèvements sont effectués après une période appropriée, qui est de 3 à 5 heures pour la souris et de 4 à 5 heures pour le hamster chinois. Les cellules sont prélevées de la moelle osseuse et analysées en vue de la détection d'aberrations chromosomiques.

1.5.3. Niveaux de dose

Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose requis, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et la même modalité de traitement que ceux de l'étude principale (5). En cas de toxicité, on utilise trois niveaux de dose pour le premier prélèvement. Ces niveaux de dose doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale. Pour les prélèvements suivants, seule la dose la plus élevée est utilisée.

Celle-ci est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées selon les mêmes modalités, seraient létales. Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées cas par cas. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans la moelle osseuse (par exemple une diminution de plus de 50 % de l'index mitotique).

1.5.4. Test limite

Si un essai réalisé avec au moins 2 000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète avec trois niveaux de doses n'est pas nécessaire. Pour les études de plus longue durée, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel par jour dans le cas d'un traitement d'une durée allant jusqu'à 14 jours et de 1 000 mg/kg de poids corporel par jour pour les études plus longues. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans l'essai de dose limite.

1.5.5. Voies d'administration

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation adaptée, ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6. Préparation des chromosomes

La moelle osseuse est extraite immédiatement après le sacrifice, exposée à une solution hypotonique et fixée.

Les cellules sont alors étalées sur des lames et colorées.

1.5.7. Analyse

L'index mitotique sert de mesure de la cytotoxicité et doit être déterminé sur un minimum de 1 000 cellules pour chaque animal traité (y compris les témoins positifs) et pour chaque témoin négatif non traité.

L'analyse des aberrations chromosomiques doit porter sur au moins 100 cellules de chaque animal. Ce nombre peut être réduit lorsque les aberrations observées sont nombreuses. Toutes les lames, y compris celles des témoins négatifs et positifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope. Comme le procédé de fixation provoque souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, entraînant une perte de chromosomes, toutes les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal à $2n \pm 2$.

2. RESULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RESULTATS

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Pour chaque animal, on indiquera le nombre de cellules examinées et on évaluera le nombre d'aberrations par cellule ainsi que le pourcentage de cellules présentant une ou plusieurs aberrations de structure. Les différents types d'aberrations chromosomiques de structure doivent être consignés avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes traités et les groupes témoins. Les lacunes sont enregistrées séparément et rapportées mais ne sont généralement pas incluses dans la fréquence totale des aberrations. S'il n'y a pas de différence de réponse entre sexes, les données des deux sexes peuvent être combinées dans l'analyse statistique.

2.2. EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement dose-dépendant du nombre relatif de cellules présentant des aberrations ou une augmentation nette du nombre de cellules présentant des aberrations dans un seul groupe traité à un seul temps de prélèvement. En premier lieu, il s'agit de déterminer la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (6) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées.

Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que la substance d'essai est capable d'induire des aberrations de nombre. Une augmentation du nombre de cellules présentant des chromosomes endoredupliqués peut indiquer que la substance d'essai est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (7) (8).

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats manifestement positifs ou négatifs, dans de rares cas l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas de conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus dans cet essai in vivo d'aberration chromosomique indiquent qu'une substance induit des aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de l'espèce testée. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance testée n'induit pas d'aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de l'espèce testée.

Le fait que la substance d'essai ou ses métabolites atteignent la circulation générale ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systémique) doit être discuté.

3. RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Solvant/véhicule :

- justification du choix du véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience :

- espèce/souche utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids individuel des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales :

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule),
- résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,
- justification du choix des doses employées,
- détails concernant la préparation 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 la grande circulation ou le tissu cible, le cas échéant,
- conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai 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 modalités de traitement et de prélèvement,
- méthodes de mesure de la toxicité,
- nature et concentration de l'inhibiteur du fuseau mitotique et durée du traitement,
- méthodes de préparation des lames,
- critères de dénombrement des aberrations,
- nombre de cellules analysées par animal,
- critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats :

- signes de toxicité,
- index mitotique,
- type et nombre d'aberrations, séparément pour chaque animal,
- nombre total d'aberrations par groupe, moyennes et écarts-types,
- nombre de cellules présentant des aberrations par groupe, moyennes et écarts-types,
- changements de la ploïdie, le cas échéant,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données concernant les témoins négatifs concomitants,
- données concernant les témoins négatifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types),
- données concernant les témoins positifs concomitants.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Adler, I. D. (1984), *Cytogenetic Tests in Mammals*, in : *Mutagenicity Testing : a Practical Approach*, S. Venitt and J. M. Parry (eds.), IRL Press, Oxford, Washington D. C., pp. 275-306.
- (2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), *Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays : Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells*, *Mutation Res.*, 189, 157-165.
- (3) Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In Vivo Cytogenetic Assays*, in : D. J. Kirkland, (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures*. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (4) Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *Report from the Working Group on the In Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test*, *Mutation Res.*, 312, pp. 305-312.
- (5) Fielder, R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), *Report of British Toxicology Society/ UK, Environmental Mutagen Society Working Group : Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays*, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), *Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays*, in : UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
- (7) Locke-Huhle, C. (1983), *Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest*, *Mutation Res.* 119, pp. 403-413.
- (8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), *Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells*, *Cancer Res.*, 43, pp. 1363-1364. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 11 juillet 2001.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,

Mme M. AELVOET

Annexe I C

« B.12. MUTAGENICITE — ESSAI IN VIVO DU MICRONOYAU SUR ERYTHROCYTES DE MAMMIFÈRE

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 474, Test du micronoyau sur les érythrocytes de mammifère (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai du micronoyau in vivo sur des cellules de mammifère est pratiqué en vue de détecter des lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes résultant de l'action d'une substance d'essai. Il repose sur l'analyse d'érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse et/ou dans le sang périphérique d'animaux, généralement des rongeurs.

L'essai du micronoyau est destiné à identifier les substances qui provoquent les lésions cytogénétiques se traduisant par la formation de micronoyaux contenant des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers.

Lorsqu'un érythroblaste de moelle osseuse se transforme en érythrocyte polychromatique, le noyau principal est expulsé et chaque micronoyau qui s'est formé peut subsister dans le cytoplasme anucléé. La visualisation des micronoyaux est facilitée par l'absence du noyau principal. Un accroissement de la fréquence des micronoyaux dans les érythrocytes polychromatiques des animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique induite.

La moelle osseuse des rongeurs est couramment utilisée dans cet essai, les érythrocytes polychromatiques étant produits dans ce tissu. Le comptage des érythrocytes immatures (polychromatiques) micronucléés dans le sang périphérique est également acceptable chez toute espèce où l'on a démontré l'incapacité de la rate à éliminer les érythrocytes micronucléés ou qui présente une sensibilité suffisante pour permettre la détection des agents provoquant des aberrations chromosomiques de structure ou de nombre. Plusieurs critères permettent de distinguer les micronoyaux. Un de ces critères est la détection de la présence ou de l'absence dans les micronoyaux d'un centromère ou d'ADN centromérique. La fréquence des érythrocytes immatures (polychromatiques) micronucléés est le principal critère. Quand les animaux sont traités en continu pendant quatre semaines ou plus, on peut également rechercher dans le sang périphérique la proportion des érythrocytes matures (normochromatiques) contenant des micronoyaux par rapport à un nombre donné d'érythrocytes matures.

Cet essai in vivo du micronoyau pratiqué sur des érythrocytes de mammifère se prête particulièrement bien à l'évaluation des risques mutagènes, en ce sens qu'il permet de prendre en compte des facteurs du métabolisme in vivo, de pharmacocinétique et des processus de réparation de l'ADN, malgré la variabilité de ces facteurs en fonction de l'espèce, du tissu et de l'effet génétique recherché. Un essai in vivo sert aussi à vérifier un effet mutagène détecté dans un système in vitro.

On n'aura pas recours à cet essai s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DEFINITIONS

Centromère : portion d'un chromosome qui au cours de la division cellulaire est lié aux fibres du fuseau mitotique permettant un mouvement ordonné des chromosomes filles vers les pôles des cellules filles.

Micronoyau : petit noyau, présent en plus du noyau principal des cellules et séparé de celui-ci, produit pendant la télophase de la mitose (méiose) par des chromosomes ou des fragments de chromosomes retardataires.

Erythrocyte normochromatique : érythrocyte mature dépourvu de ribosomes et pouvant être distingué des érythrocytes immatures polychromatiques à l'aide de substances colorant sélectivement les ribosomes.

Erythrocyte polychromatique : érythrocyte immature se trouvant à un stade de développement intermédiaire, qui renferme encore des ribosomes et peut ainsi être distingué des érythrocytes matures normochromatiques à l'aide de substances colorant sélectivement les ribosomes.

1.3. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés à la substance d'essai par une voie d'exposition appropriée. Si on utilise la moelle osseuse, les animaux sont sacrifiés à des moments appropriés après le traitement, la moelle est extraite, préparée sur des lames et colorée (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Lorsqu'on utilise le sang périphérique, ce dernier est prélevé à des moments appropriés après le traitement, les cellules sanguines sont étalées sur des lames et colorées (4) (8) (9) (10). En cas d'essai sur cellules du sang périphérique, il faut recueillir les cellules aussi rapidement que possible après la dernière exposition. Les lames préparées sont soumises à une analyse en vue de la détection de micronoyaux.

1.4. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1. Préparations

1.4.1.1. Sélection des espèces animales

L'utilisation de souris ou de rats est recommandée en cas d'essai sur moelle osseuse, bien que n'importe quelle espèce de mammifère appropriée puisse être employée. Si l'essai porte sur le sang périphérique, on recommande d'utiliser des souris. Il est toutefois possible d'utiliser n'importe quelle espèce de mammifère appropriée, à condition que sa rate n'élimine pas les érythrocytes micronucléés ou que sa sensibilité soit suffisante pour permettre la détection d'agents qui provoquent des aberrations chromosomiques de structure ou de nombre. Il convient d'utiliser des animaux adultes, jeunes et sains issus de souches couramment utilisées en laboratoire. Au début de l'étude, la différence pondérale entre les animaux ne doit pas dépasser $\pm 20\%$ du poids moyen de chaque sexe.

1.4.1.2. Conditions d'encagement et régime alimentaire

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60 %.

1.4.1.3. Préparations des animaux

Les animaux sont répartis par randomisation entre les groupes témoins et les groupes traités. Les animaux sont identifiés individuellement. Ils sont gardés dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude, de façon à les acclimater aux conditions du laboratoire. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement.

1.4.1.4. Préparation des doses

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant d'être administrées aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2. Conditions expérimentales

1.4.2.1. Solvant/véhicule

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données faisant état de leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible.

1.4.2.2. Témoins

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent être inclus pour chaque sexe et chaque essai. Les animaux des groupes témoins sont manipulés exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent produire des micronoyaux *in vivo* à des niveaux d'exposition supposés conduire à un accroissement détectable par rapport au bruit de fond. Les doses de témoin positif doivent être choisies de façon que les effets soient nets et que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examineur. Le témoin positif peut être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai et un seul prélèvement d'échantillon peut suffire. En outre, l'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'ils sont disponibles. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Substance	Numéro CAS	Numéro Eines
Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
N-ethyl N-nitrosourée	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamide Monohydrate de cyclophosphamide	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Triéthylènemélatamine	51-18-3	200-083-5

Lors de chaque prélèvement, il faut inclure un lot d'animaux témoins négatifs traités seulement avec le solvant ou le véhicule et par ailleurs manipulés de la même façon que les groupes traités. Ceci peut être évité si l'on dispose de données acceptables sur la variabilité interindividuelle et la fréquence spontanée de cellules comportant des micronoyaux provenant de témoins historiques. Dans le cas où un seul prélèvement est effectué pour les témoins négatifs, le premier temps de prélèvement est le plus approprié. En outre, des témoins non traités doivent aussi être inclus, à moins que des données historiques ne démontrent que le solvant/véhicule choisi n'induit aucun effet délétère ou mutagène.

Si le sang périphérique est utilisé, un échantillon prélevé avant le traitement peut aussi tenir lieu de témoin négatif, mais uniquement dans les études de courte durée sur sang périphérique (par exemple 1 à 3 traitements) lorsque les résultats se situent dans l'intervalle auquel on peut s'attendre sur la base de données historiques.

1.5. MODE OPERATOIRE

1.5.1. Nombre et sexe des animaux

Chaque groupe traité et groupe témoin doit comprendre au moins cinq animaux analysables par sexe (11). Si, au moment de l'étude, on dispose de données d'études antérieures effectuées avec la même espèce et ayant utilisé la même voie d'administration, qui démontrent l'absence de différence importante de toxicité entre les sexes, il suffit d'effectuer l'essai avec des animaux d'un seul sexe. Si l'exposition humaine est spécifique du sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés pour l'essai.

1.5.2. Modalité de traitement

Aucune modalité particulière de traitement (un, deux ou davantage de traitements à intervalles de 24 heures) ne peut être recommandée. Les prélèvements qui proviennent d'une étude avec des procédures d'administration prolongées sont acceptables si l'essai est positif ou, pour les essais négatifs, si un effet toxique est observé ou que la dose limite a été employée et que la substance a été administrée jusqu'au moment du prélèvement.

La substance d'essai peut aussi être administrée en doses fractionnées (deux doses le même jour avec un intervalle de quelques heures au maximum) afin que l'administration d'un grand volume soit plus aisée.

L'essai peut être effectué de deux façons :

a) La substance d'essai est administrée en une seule fois aux animaux. Des échantillons de moelle osseuse sont prélevés au moins deux fois, jamais avant 24 heures et pas au-delà de 48 heures après le traitement et à un intervalle approprié. Des prélèvements effectués moins de 24 heures après le traitement doivent avoir une justification. Les échantillons de sang périphérique sont prélevés au moins deux fois, jamais avant 36 heures et pas au-delà de 72 heures après le traitement et à un intervalle approprié. Si une réponse positive est observée lors d'un prélèvement, il n'est pas nécessaire de procéder à un autre prélèvement.

b) Dans le cas où deux doses ou plus sont administrées (par exemple deux doses ou plus à intervalle de 24 heures), les échantillons de moelle osseuse doivent être prélevés une seule fois entre 18 et 24 heures après le dernier traitement, et ceux de sang périphérique une seule fois entre 36 et 48 heures après le dernier traitement (12).

Des temps de prélèvements supplémentaires peuvent être envisagés si nécessaire.

1.5.3. Niveaux de dose

Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose requis, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et la même modalité de traitement que ceux de l'étude principale (13). En cas de toxicité, on utilise trois niveaux de dose pour le premier prélèvement. Ces niveaux de doses doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale. Pour les prélèvements suivants, seule la dose la plus élevée est utilisée.

Celle-ci est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées selon les mêmes modalités, seraient létales. Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées cas par cas. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans la moelle osseuse (par exemple une diminution de la proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes dans la moelle osseuse ou le sang périphérique).

1.5.4. Test limite

Si un essai réalisé avec au moins 2 000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète avec trois niveaux de doses n'est pas nécessaire. Pour les études de plus longue durée, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel par jour dans le cas d'un traitement d'une durée allant jusqu'à 14 jours et de 1 000 mg/kg de poids corporel par jour pour les études plus longues. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans l'essai de dose limite.

1.5.5. Voie d'administration

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation adaptée, ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6. Préparation de la moelle osseuse et du sang

Les cellules de moelle osseuse sont généralement prélevées dans le fémur ou le tibia immédiatement après le sacrifice. Les cellules sont extraites, préparées et colorées suivant des méthodes bien établies. Le sang périphérique est prélevé dans la veine caudale ou un autre vaisseau sanguin approprié. On effectue immédiatement une coloration supravitale des cellules sanguines (8) (9) (10) ou des frottis qui sont ensuite colorés. L'emploi d'un colorant spécifique de l'ADN [par exemple, l'orange d'acridine (14) ou Hoechst 33258 plus pyronine-Y (15)] peut éliminer une partie des artefacts dus à l'utilisation d'un colorant non spécifique de l'ADN. Cet avantage n'exclut pas l'emploi de colorants classiques (Giemsa, par exemple). D'autres méthodes, telles que celle basée sur l'emploi de colonnes de cellulose pour enlever les cellules nucléées (16), peuvent être utilisées à condition que leur efficacité pour la préparation de micronoyaux dans le laboratoire ait été prouvée.

1.5.7. Analyse

Le pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes (immatures + matures) est déterminé pour chaque animal en comptant au moins 200 érythrocytes dans le cas de la moelle osseuse et 1 000 érythrocytes dans le cas du sang périphérique (17). Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope. L'incidence des érythrocytes immatures micronucléés est déterminée sur la base de l'examen d'au moins 2 000 érythrocytes immatures par animal. On peut obtenir des informations supplémentaires en recherchant la présence de micronoyaux dans les érythrocytes matures. À l'examen des lames, le pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes ne doit pas être inférieur à 20 % de la valeur des témoins. Lorsque les animaux sont traités en continu pendant 4 semaines ou davantage, on peut aussi examiner au moins 2 000 érythrocytes matures par animal pour déterminer l'incidence des érythrocytes matures micronucléés.

Des systèmes d'analyse automatisée (analyse d'images et cytométrie de flux pour cellules en suspension) peuvent remplacer des techniques manuelles s'ils sont justifiés et validés.

2. RESULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RESULTATS

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Le nombre d'érythrocytes immatures examinés, le nombre d'érythrocytes immatures micronucléés et le nombre d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes doivent être présentés séparément pour chaque animal analysé. Lorsque les animaux sont traités en continu pendant quatre semaines ou davantage, il convient de fournir également les données relatives aux érythrocytes matures, si elles ont été recueillies. Le pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes et, si cela est jugé pertinent, le pourcentage d'érythrocytes micronucléés seront indiqués pour chaque animal. S'il n'y a pas de différence de réponse entre sexes, les données des deux sexes peuvent être combinées dans l'analyse statistique.

2.2. EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment une augmentation, dose-dépendante, du nombre de cellules micronucléées ou une augmentation nette du nombre de cellules micronucléées dans un seul groupe traité à un seul temps de prélèvement. En premier lieu, il s'agit de déterminer la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (18) (19) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance étudiée.

Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus dans cet essai in vivo du micronoyau indiquent que la substance induit la formation de micronoyaux qui résultent de lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique dans les érythroblastes de l'espèce testée. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance testée n'induit pas la formation de micronoyaux dans les érythrocytes immatures de l'espèce testée.

Le fait que la substance d'essai ou ses métabolites atteignent la circulation générale ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systémique) doit être discuté.

3. RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Solvant/véhicule :

- justification du choix du véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience :

- espèce/souche utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids individuel des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales :

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule),
- résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,
- justification du choix des doses employées,
- détails concernant la préparation 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 la circulation générale ou le tissu cible, le cas échéant,
- conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai 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 modalités de traitement et de prélèvement,
- méthodes de préparation des lames,
- méthodes de mesure de la toxicité,
- critères de dénombrement des érythrocytes immatures micronucléés,
- nombre de cellules analysées par animal,
- critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats :

- signes de toxicité,
- proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes,
- nombre d'érythrocytes immatures micronucléés, donné séparément pour chaque animal,
- moyenne \pm écart-type des érythrocytes micronucléés immatures par groupe,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses et méthodes statistiques appliquées,
- données concernant les témoins négatifs concomitants et antérieurs,
- données concernant les témoins positifs concomitants.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187-190.
- (2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9-15.
- (3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, pp. 61-118.
- (4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29-80.
- (5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes : A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in : *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp., 555-558.
- (6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R. and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103-112.
- (7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test : Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513-522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 245-249.
- (9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining : The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 83-98.
- (10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS : The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 153-159.
- (11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), In Vivo, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293-304.
- (12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 \pm 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 313-319.
- (13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., HodsonWalker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group : Dose Setting in In Vivo Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241-247.
- (15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, pp. 269-275.
- (16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, pp. 91-104.
- (17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, pp. 97-99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), In Vivo Cytogenetics Assay, in : D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report, Part I, revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in : D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 11 juillet 2001.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,

Mme M. AELVOET

Annexe I D

« B.13/14. MUTAGENICITE — ESSAI DE MUTATION REVERSE SUR BACTERIES

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 471, Essai de mutation réverse sur des bactéries (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai bactérien de mutation réverse est pratiqué sur des souches de *Salmonella typhimurium* et d'*Escherichia coli* auxotrophes à l'égard d'un acide aminé. Il sert à détecter des mutations ponctuelles résultant de la substitution, de l'addition ou de la délétion d'une ou de plusieurs paires de base de l'ADN (1) (2) (3). Le principe de cet essai repose sur la détection de mutations qui inversent des mutations présentes dans la souche d'essai et rétablissent ainsi la capacité fonctionnelle des bactéries de synthétiser un acide aminé essentiel. Les bactéries révertantes sont détectées d'après leur capacité de se développer en l'absence de l'acide aminé requis par la souche d'essai parentale.

Les mutations ponctuelles sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et de nombreuses données tendent à démontrer que des mutations ponctuelles frappant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs dans des cellules somatiques jouent un rôle dans le développement de tumeurs tant chez l'homme que chez les animaux de laboratoire. L'essai bactérien de mutation réverse est rapide, peu coûteux et relativement facile à effectuer. Beaucoup de souches utilisées possèdent entre autres particularités, celles de les rendre plus sensibles aux mutations : séquences d'ADN plus sensibles aux mutations au niveau des sites de réversion, augmentation de perméabilité cellulaire pour les grosses molécules, élimination des systèmes de réparation de l'ADN ou favorisation (augmentation) des processus induisant des erreurs lors de la réparation de l'ADN. La spécificité des souches d'essai peut fournir des informations utiles sur les types de mutations induites par les agents génotoxiques. On dispose pour les essais bactériens de mutation réverse de très nombreux résultats pour une grande variété de structures et d'une méthodologie d'essai qui est bien au point et qui peut être appliquée à des substances ayant des propriétés physico-chimiques très diverses, y compris les composés volatils.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DEFINITIONS

Un essai de mutation réverse chez *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli* détecte, chez une souche dont la croissance requiert la présence d'un acide aminé (respectivement histidine ou tryptophane), des mutations qui transforment cette souche en une souche dont la croissance s'effectue indépendamment d'un rapport extérieur de cet acide aminé.

Les mutagènes provoquant la substitution de paires de base sont des agents qui entraînent le remplacement d'une base de l'ADN. Lors d'un essai de réversion, cette modification peut avoir lieu sur le site de la mutation initiale ou sur un autre site du génome bactérien.

Les mutagènes décalant le cadre de lecture sont des agents qui provoquent l'addition ou la délétion d'une ou de plusieurs paires de base dans l'ADN, modifiant ainsi le cadre de lecture dans l'ARN.

1.3. CONSIDERATIONS PRELIMINAIRES

L'essai bactérien de mutation réverse porte sur des cellules procaryotes qui diffèrent des cellules de mammifère notamment du point de vue de l'absorption, du métabolisme, de la structure des chromosomes et des processus de réparation de l'ADN. Les essais in vitro nécessitent généralement une activation métabolique exogène.

Comme les systèmes d'activation métabolique in vitro ne peuvent pas reproduire parfaitement le métabolisme de cellules de mammifère in vivo, les essais ne fournissent pas directement des informations sur le pouvoir mutagène et carcinogène d'une substance chez les mammifères.

L'essai de mutation réverse sur bactéries est couramment employé comme première étape pour la détection de l'activité génotoxique en général et des mutations ponctuelles en particulier. De nombreuses données démontrent que beaucoup de substances chimiques qui se révèlent positives dans cet essai présentent aussi une activité mutagène dans d'autres essais. Certains agents mutagènes ne sont pas décelés par ces systèmes d'essai. Ces défaillances peuvent tenir à la nature particulière de l'effet détecté, à des différences sur le plan de l'activation métabolique ou à des différences de biodisponibilité. D'autre part, les facteurs qui amplifient la sensibilité de l'essai de mutation réverse sur bactéries peuvent conduire à une surestimation de l'activité mutagène.

L'essai de mutation réverse sur bactéries peut ne pas convenir pour l'évaluation de certaines classes de substances chimiques, par exemple les composés fortement bactéricides (certains antibiotiques, par exemple) et ceux dont on soupçonne (ou on sait) qu'ils interfèrent spécifiquement avec le système de réplication des cellules de mammifère (par exemple les inhibiteurs de la topoisomérase ou certains analogues de nucléosides).

Dans de tels cas, des essais de mutation sur des cellules de mammifère peuvent s'avérer plus appropriés.

Bien que de nombreux composés qui donnent un résultat positif à cet essai soient cancérigènes pour les mammifères, la corrélation n'est pas parfaite. Celle-ci dépend de la classe chimique et il existe des substances cancérigènes qui ne sont pas détectées par cet essai parce qu'elles agissent par des mécanismes non génotoxiques ou par des mécanismes qui sont absents des cellules bactériennes.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Des bactéries en suspension sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène. Dans le cas de la méthode d'incorporation directe (méthode par étalement), ces suspensions sont mélangées avec la gélose de surface et déposées immédiatement sur le milieu minimal. Dans le cas de la méthode avec préincubation, le mélange de bactéries en suspension-substance testée est incubé et ensuite mélangé avec un couche de gélose de surface avant d'être étalé sur le milieu minimal. Dans les deux techniques, après deux ou trois jours d'incubation, les colonies révertantes sont comptées et leur nombre est comparé à celui des révertants spontanés dans les boîtes témoins traitées avec le solvant.

Plusieurs méthodes permettant de réaliser l'essai de mutation réverse sur bactéries ont été décrites. Parmi celles qui sont communément utilisées figure la méthode par incorporation directe (1) (2) (3) (4), la méthode de la préincubation (2) (3) (5) (6) (7) (8), la méthode de la fluctuation (9) (10) et la méthode par suspension (11).

Des méthodes modifiées pour les essais avec des gaz ou des vapeurs ont été décrites (12).

Les modes opératoires décrits se réfèrent principalement aux méthodes d'incorporation directe et de préincubation. Chacune de ces méthodes peut être utilisée avec et sans activation métabolique. L'utilisation de la méthode avec préincubation permet de détecter plus efficacement l'effet mutagène de certaines substances.

Ces substances appartiennent à des classes chimiques qui comprennent les nitrosamines aliphatiques à chaînes courtes, les métaux bivalents, les aldéhydes, les colorants azoïques et les composés diazoïques, les alcaloïdes pyrrolizidiniques, les composés allyliques et nitrés (3). Il est également admis que certaines classes de mutagènes ne sont pas toujours détectées par les méthodes conventionnelles telles que l'incorporation directe ou la préincubation. Ces substances doivent être considérées comme des cas particuliers et il est fortement recommandé d'utiliser d'autres méthodes de détection. On a pu mettre en évidence les cas particuliers suivants (ainsi que des exemples de méthodes qui pourraient servir à leur détection) : colorants azoïques et composés diazoïques (3) (5) (6) (13), gaz et substances chimiques volatiles (12) (14) (15) (16), glycosides (17) (18). Tout écart par rapport au mode opératoire standard demande à être scientifiquement justifié.

1.5. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.5.1. Préparations

1.5.1.1. Bactéries

On laisse des cultures fraîches de bactéries se développer jusqu'à la fin de la phase exponentielle ou jusqu'au début de la phase stationnaire de croissance (environ 10^9 cellules par ml). Des cultures en fin de phase stationnaire ne doivent pas être utilisées. Il est essentiel que les cultures utilisées pour cet essai présentent une concentration élevée de bactéries viables. La concentration peut être déterminée à partir des données historiques sur les courbes de croissance des souches bactériennes utilisées ou, lors de chaque essai, par la détermination du nombre de cellules viables à l'aide de la méthode par étalement.

La température d'incubation recommandée est de 37°C.

Au moins cinq souches de bactéries doivent être employées. Celles-ci doivent comprendre quatre souches de *S. typhimurium* (TA1535, TA1537 ou TA97a ou TA97, TA98 et TA100) pour lesquelles des comparaisons entre laboratoires ont démontré la fiabilité et la reproductibilité de la réponse. Ces souches, qui comportent des paires de bases GC sur les sites primaires de réversion, risquent toutefois de ne pas déceler certains mutagènes oxydants, des agents de réticulation et des hydrazines. Ces substances mutagènes peuvent être détectées à l'aide de souches d'*E. coli* WP2 ou de *S. typhimurium* TA102 (19) qui ont une paire de base AT sur le site primaire de réversion. Par conséquent, il est recommandé de mettre en œuvre la combinaison de souches suivante :

- *S. typhimurium* TA1535 et
- *S. typhimurium* TA1537 ou TA97 ou TA97a et
- *S. typhimurium* TA98 et
- *S. typhimurium* TA100 et
- *E. coli* WP2 uvrA ou *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) ou *S. typhimurium* TA102.

Pour les mutagènes à pourvoir réticulant, il peut être préférable d'inclure la souche TA102 ou d'ajouter une souche d'*E. coli* pourvue d'un mécanisme de réparation de l'ADN [*E. coli* WP2 ou *E. coli* WP2 (pKM101), par exemple].

La préparation des cultures souches, la vérification des marqueurs et le stockage doivent s'effectuer suivant des méthodes reconnues. Pour chaque culture souche congelée, il faut démontrer que la croissance exige la présence d'un acide aminé (histidine pour *S. typhimurium* et tryptophane pour *E. coli*). D'autres caractéristiques phénotypiques demandent également à être vérifiées, à savoir la présence ou l'absence de plasmides de résistance, s'il y a lieu [résistance à l'ampicilline des souches TA98, TA100 et TA97a ou TA97, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101), et résistance à l'association ampicilline/tétracycline de la souche TA102], ainsi que la présence de mutations caractéristiques (à savoir la mutation rfa chez *S. typhimurium* d'après la sensibilité au cristal violet et la mutation uvrA chez *E. coli* ou uvrB chez *S. typhimurium* d'après la sensibilité aux UV) (2) (3).

D'autre part, les souches doivent produire un nombre de colonies de révertants spontanés par boîte qui se situe dans la gamme de fréquence prévue sur la base des données historiques du laboratoire et de préférence être comparable aux valeurs citées dans la littérature.

1.5.1.2. Milieu

On utilise une gélose minimale appropriée (composée, par exemple, de milieu minimal E de Vogel-Bonner et de glucose) et une gélose de recouvrement contenant de l'histidine et de la biotine ou du tryptophane pour permettre quelques divisions cellulaires (1) (2) (9).

1.5.1.3. Activation métabolique

Les bactéries sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus communément utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foie de rongeur traité avec des inducteurs enzymatiques comme Aroclor 1254 (1) (2) ou une combinaison de phénobarbital et de β -naphthoflavone (18) (20) (21). La fraction post-mitochondriale est généralement utilisée à une concentration comprise entre 5 et 30 % v/v dans le mélange S9. Le choix et la composition du système d'activation métabolique peuvent varier suivant la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas, il peut être intéressant d'utiliser plusieurs concentrations de la fraction post-mitochondriale. Dans le cas de composés azoïques et diazoïques, un système d'activation métabolique réducteur peut s'avérer plus approprié (6) (13).

1.5.1.4. Substance d'essai/préparation

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, plus éventuellement diluées avant le traitement des bactéries. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées au système d'essai directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir chimiquement avec la substance d'essai ni altérer la survie des bactéries et l'activité du mélange S9 (22). L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible. Dans les essais de substances qui sont instables dans l'eau, on utilisera des solvants organiques exempts d'eau.

1.5.2. Conditions expérimentales

1.5.2.1. Souches utilisées (voir point 1.5.1.1)

1.5.2.2. Concentration d'exposition

La cytotoxicité et la solubilité dans le mélange d'essai final sont des critères à prendre en considération pour déterminer la dose la plus élevée à mettre en œuvre.

Un essai préliminaire destiné à déterminer la toxicité et les caractéristiques de solubilité peut être utile. La cytotoxicité peut être détectée par une réduction du nombre de révertants, un éclaircissement ou une diminution du tapis bactérien ou une diminution du taux de survie des cultures traitées. Les systèmes d'activation métabolique peuvent avoir une influence sur la cytotoxicité d'une substance. On conclut à l'insolubilité lorsqu'une précipitation dans le mélange final est observée à l'œil nu dans les conditions réelles de l'essai.

Pour les substances d'essai solubles et non cytotoxiques, on recommande une concentration maximale de 5 mg ou 5 μ l par boîte. Pour les substances d'essai non cytotoxiques qui sont insolubles à 5 mg ou 5 μ l par boîte, l'essai doit comprendre une ou plusieurs concentrations auxquelles on observe une insolubilité. Pour les substances qui sont déjà cytotoxiques à une concentration inférieure à 5 mg ou 5 μ l/boîte, l'essai doit être effectué jusqu'à une concentration cytotoxique. Le précipité ne doit pas interférer avec l'évaluation des résultats.

Pour un premier essai, il convient de tester au moins cinq concentrations analysables différentes de la substance d'essai, avec des intervalles d'environ une demi-unité logarithmique, c'est-à-dire $\sqrt{10}$. Pour établir une relation dose-réponse, il peut s'avérer nécessaire de réduire ces intervalles. Dans le cas de substances d'essai contenant des quantités substantielles d'impuretés potentiellement mutagènes, il peut être utile d'effectuer des essais avec des concentrations supérieures à 5 mg ou 5 μ l/boîte.

1.5.2.3. Témoins négatifs et positifs

Des témoins positifs spécifiques de la souche, et des témoins négatifs (solvant ou véhicule), doivent être inclus dans chaque essai, avec ou sans activation métabolique. Dans le cas des témoins positifs, on utilisera une concentration permettant de démontrer l'efficacité de chaque essai.

Pour les essais avec système d'activation métabolique, le ou les témoins positifs de référence doivent être choisis en fonction du type de souche bactérienne utilisé.

Les substances suivantes sont des exemples de témoins positifs pour les essais avec activation métabolique :

Substance	Numéro CAS	Numéro Eines
Diméthyl-9,10 anthracène	781-43-1	212-308-4
Diméthyl-7,12 benz[a]anthracène	57-97-6	200-359-5
Benzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5
Amino-2 anthracène	613-13-8	210-330-9
Cyclophosphamide Monohydrate de cyclophosphamide	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

La substance suivante convient comme témoin positif pour la méthode d'activation métabolique réductrice :

Substance	Numéro CAS	Numéro Eines
Rouge Congo	573-58-0	209-358-4

L'acido-2 anthracène ne peut être utilisé comme indicateur unique de l'efficacité du mélange S9. S'il est utilisé, il faut également caractériser chaque lot de S9 avec un mutagène qui requiert une activation métabolique par des enzymes microsomaux, benzo[a]pyrène et diméthylbenzanthracène par exemple.

Les substances suivantes sont des exemples de témoins positifs spécifiques de souches pour les essais sans activation métabolique exogène :

Substance	Numéro CAS	Numéro Eines	Souche
Azoture de sodium	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 et TA 100
Nitro-2 fluorène	607-57-8	210-138-5	TA 98
Amino-9 acridine	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 et TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 et TA 97a
Hydroperoxyde de cumène	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA et TA 102
N-éthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101)
1-oxyde de 4-nitroquinoléine	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101)
Furylfuramide (AF2)	3688-53-7		Souches contenant des plasmides

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés comme référence. L'utilisation de témoins positifs appartenant à la même classe chimique doit être envisagée, s'ils sont disponibles.

L'essai doit comprendre des témoins négatifs constitués de solvant ou véhicule sans substances d'essai, auxquels sont appliquées les mêmes conditions expérimentales qu'à la substance d'essai. Il faut également inclure des témoins non traités, à moins que des essais antérieurs n'aient démontré que le solvant choisi n'a pas d'effet délétère ou mutagène.

1.5.3. Mode opératoire

Pour la méthode par étalement (1) (2) (3) (4) sans activation métabolique, on ajoute généralement 0,05 ml ou 0,1 ml de la solution à tester, 0,1 ml de culture bactérienne fraîche (contenant environ 10^8 cellules viables) et 0,5 ml de tampon stérile à 2,0 ml de gélose de recouvrement. Pour l'essai avec activation métabolique, on mélange habituellement 0,5 ml du mélange d'activation métabolique contenant une quantité adéquate de fraction post-mitochondriale (entre 5 et 30 % v/v), les bactéries et la substance d'essai, ou une solution de celle-ci, avec 2,0 ml de gélose de recouvrement. Le contenu de chaque tube est mélangé et versé sur la surface d'un milieu minimal gélosé. On laisse la gélose de recouvrement se solidifier avant incubation.

Dans la méthode de la préincubation (2) (3) (5) (6), la substance d'essai, ou une solution de celle-ci, est préincubée avec la souche d'essai (environ 10^8 cellules viables) et un tampon stérile ou 0,5 ml du système d'activation métabolique généralement pendant 20 minutes ou plus à 30-37°C. On ajoute ensuite la gélose de recouvrement et on verse le tout sur la surface d'un milieu minimal gélosé. On mélange généralement 0,05 ou 0,1 ml de la substance d'essai, ou d'une solution de celle-ci, 0,1 ml de bactéries et 0,5 ml de mélange S9 ou de tampon stérile avec 2,0 ml de gélose de recouvrement. Pendant la préincubation, les tubes doivent être aérés par agitation.

Pour une bonne estimation de la variation, chaque concentration doit être testée dans trois boîtes de Petri. Le nombre de boîtes peut être limité à deux si cela se justifie scientifiquement. La perte accidentelle d'une boîte n'invalide pas nécessairement l'essai.

Les substances gazeuses ou volatiles doivent être testées en utilisant des méthodes appropriées, par exemple dans des récipients hermétiquement fermés (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Incubation

Toutes les boîtes d'un essai donné doivent être incubées à 37°C pendant 48-72 heures. À la fin de la période d'incubation, on compte dans chaque boîte le nombre de colonies révertantes.

2. RESULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RESULTATS

Les données doivent être présentées sous la forme du nombre de colonies révertantes par boîte. Le nombre de colonies révertantes dans les boîtes de témoins négatifs (témoins traités avec le solvant et, le cas échéant, témoins non traités) et positifs doit également être mentionné. Le dénombrement par boîte, le nombre moyen de colonies révertantes par boîte et l'écart-type doivent être indiqués pour la substance d'essai ainsi que pour les témoins positifs et négatifs (non traités et/ou traités au solvant).

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse nettement positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées. Les résultats négatifs demandent à être confirmés cas par cas. Si la confirmation de résultats négatifs n'est pas jugée nécessaire, une justification doit être fournie. Pour les essais de confirmation, il convient d'envisager une modification des conditions expérimentales, afin d'élargir la gamme des conditions évaluées. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'écart entre les doses, la méthode de traitement (étalement ou préincubation en milieu liquide) et les conditions d'activation métabolique.

2.2. EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement, dose-dépendant, du nombre de révertants ou une augmentation reproductible du nombre de colonies de révertants par boîte à une ou plusieurs concentrations pour au moins une souche, avec ou sans activation métabolique (23). En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la signification biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (24) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats manifestement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas de conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus à l'essai de mutation réverse sur bactéries indiquent que la substance induit des mutations ponctuelles par substitution de bases ou décalage du cadre de lecture dans le génome de *Salmonella typhimurium* et/ou *Escherichia coli*. Un résultat négatif signifie que, dans les conditions de l'essai, la substance n'est pas mutagène pour l'espèce utilisée dans l'essai.

3. RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Solvant/véhicule :

- justification du choix du solvant/véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Souches :

- souches utilisées,
- nombre de cellules par culture,
- caractéristiques des souches.

Conditions expérimentales :

- quantité de substance d'essai par boîte (mg/boîte ou µl/boîte) et justification du choix des doses et du nombre de boîtes par concentration,
- milieux utilisés,
- type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,
- procédés de traitement.

Résultats :

- signes de toxicité,
- signes de précipitation,
- dénombrement par boîte,
- nombre moyen de colonies révertantes par boîte et écart-type,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants (étendues, moyennes et écarts-types),
- données concernant les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types).

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.
- (4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The Salmonella typhimurium/ Mammalian Microsomal Assay : A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, pp. 91-96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in : *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.
- (7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in : *Basic Mutagenicity Tests : UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
- (8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.
- (9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res.*, 38, pp. 33-42.
- (10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and J. W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in : *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.
- (11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella typhimurium, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.
- (13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.
- (14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
- (16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in Salmonella typhimurium, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.
- (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase : A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961-4965.
- (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of Salmonella typhimurium TA 102 with Escherichia coli WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in : *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
- (21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.
- (23) Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83-91.
- (24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in : *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 11 juillet 2001.

ALBERT

Par le Roi :

Annexe I E

« B.17. MUTAGENICITE — ESSAI IN VITRO DE MUTATION GENIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 476, Essai in vitro de mutation génique sur cellules de mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai in vitro de mutation génique sur cellules de mammifères permet de détecter des mutations géniques induites par des substances chimiques. Les lignées cellulaires appropriées comprennent des cellules de lymphome de souris L5178Y, les lignées CHO-AS52 et V79 de cellules de hamster chinois et les cellules lymphoblastoïdes humaines TK6 (1). Dans ces lignées cellulaires, les critères génétiques les plus couramment utilisés sont une mutation sur les loci de la thymidine kinase (TK) et de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT), ainsi qu'un transgène de la xanthine-guanine phosphoribosyl transférase (XPRT). Les essais de mutation TK, HPRT et XPRT détectent des gammes différentes d'effet génétiques. L'emplacement autosomique de TK et XPRT peut permettre de détecter des effets génétiques (par exemple des délétions importantes) qui ne sont pas détectés sur le locus HPRT de chromosomes X (2, 3, 4, 5, 6).

L'essai in vitro de mutation génique sur cellules de mammifère peut être pratiqué sur des cultures de lignées cellulaires établies ou de souches cellulaires. Les cellules employées sont choisies en fonction de leur potentiel de croissance en culture et de la stabilité de la fréquence de mutation spontanée.

Les essais in vitro requièrent généralement une source exogène d'activation métabolique qui ne peut pas reproduire parfaitement les conditions présentes in vivo chez les mammifères. Il faut éviter absolument d'introduire des conditions qui conduiraient à des résultats positifs ne reflétant pas une mutagenicité intrinsèque et pouvant provenir de modifications du pH ou de l'osmolalité ou d'une forte cytotoxicité (7).

Cet essai est utilisé pour le dépistage de substances pouvant être mutagènes et cancérigènes pour les mammifères. Bien que de nombreux composés donnant un résultat positif à cet essai soient cancérigènes pour les mammifères, il n'y a pas de corrélation parfaite entre cet essai et la cancérigénicité. La corrélation dépend de la classe chimique et de plus en plus d'éléments laissent penser qu'il existe des agents cancérigènes que cet essai ne permet pas de détecter parce qu'ils agissent par des mécanismes non génotoxiques ou par des mécanismes qui sont absents des cellules de mammifères (6).

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DEFINITIONS

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

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

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

Temps d'expression du phénotype : période pendant laquelle des produits géniques non modifiés disparaissent des cellules qui viennent de subir une mutation.

Fréquence de mutants : rapport cellules mutantes observées/cellules viables.

Croissance totale relative : augmentation du nombre de cellules dans le temps par rapport à une population témoin; elle est calculée comme le produit de la croissance en suspension par rapport au témoin négatif et de l'efficacité de clonage par rapport au témoin négatif.

Croissance relative en suspension : augmentation du nombre de cellules pendant la période d'expression par rapport au témoin négatif.

Viabilité : efficacité de clonage des cellules traitées au moment de l'étalement dans des conditions sélectives après la période d'expression.

Taux de survie : efficacité de clonage des cellules traitées au moment de l'étalement à la fin de la période de traitement; le taux de survie est généralement exprimé par rapport au taux de survie de la population cellulaire témoin.

1.3. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Les cellules déficientes en thymidine kinase (TK) par suite de la mutation directe $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ sont résistantes aux effets cytotoxiques de la trifluorothymidine (TFT), un analogue de la pyrimidine. Les cellules non déficientes en TK sont sensibles à la TFT, ce qui entraîne une inhibition du métabolisme cellulaire et l'arrêt de la division cellulaire. Ainsi, les cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TFT, tandis que les cellules normales, qui contiennent de la TK, ne le peuvent pas. De la même façon, des cellules déficientes en HPRT ou XPRT sont sélectionnées par leur résistance à la thio-6 guanine (TG) ou à l'aza-8 guanine (AG). Lorsqu'un analogue d'une base ou une substance apparentée à l'agent sélectif est soumis à un essai de mutation génique sur des cellules de mammifère, il convient d'en étudier soigneusement les propriétés. Il faut, par exemple, examiner toute toxicité sélective soupçonnée de la substance d'essai vis-à-vis de cellules mutantes et non mutantes.

Par conséquent, la performance du système ou de l'agent de sélection doit être confirmée lors de l'essai de substances ayant une similitude de structure avec l'agent de sélection (8).

Des cellules en suspension ou en culture monocouche sont exposées à la substance d'essai, avec et sans activation métabolique, pendant une période appropriée. Les cellules sont repiquées afin de déterminer la cytotoxicité et de laisser le phénotype s'exprimer avant la sélection des mutants (9, 10, 11, 12, 13). On détermine la cytotoxicité en mesurant l'efficacité de clonage relative (taux de survie) ou la croissance totale relative des cultures après la période de traitement. Les cultures traitées sont maintenues dans un milieu de croissance pendant une période de temps suffisante, caractéristique de chaque locus et du type de cellule choisi, afin de permettre une expression phénotypique presque optimale des mutations induites. On détermine la proportion de mutants en mettant en culture un nombre connu de cellules dans un milieu contenant l'agent sélectif pour détecter les cellules mutantes et dans un milieu exempt d'agent sélectif pour déterminer l'efficacité de clonage (viabilité). Les colonies sont comptées après une durée d'incubation appropriée. On compare le nombre de colonies mutantes en milieu sélectif au nombre de colonies en milieu non sélectif pour obtenir la proportion de mutants.

1.4. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1. Préparations

1.4.1.1. Cellules

Divers types de cellules conviennent pour ce test, entre autres : sous-clones de L5178Y, CHO, AS52, V79 ou TK6. Les cellules utilisées doivent avoir une sensibilité prouvée aux mutagènes chimiques, une efficacité de clonage élevée et une fréquence de mutation spontanée stable. On doit veiller à ce que les cellules ne soient pas contaminées par des mycoplasmes. Des cellules contaminées ne doivent pas être utilisées.

L'essai doit être conçu de façon à avoir une sensibilité et une puissance prédéterminées. Le nombre de cellules, de cultures et de concentrations de la substance d'essai utilisées doit refléter ces paramètres définis à l'avance (14). À chaque stade de l'essai, le nombre minimal de cellules viables survivant au traitement doit être basé sur la fréquence de mutation spontanée. Une règle générale consiste à utiliser un nombre de cellules au moins égal à dix fois l'inverse de cette fréquence. Cependant, il est recommandé d'utiliser au moins 10^6 cellules. Pour s'assurer de la performance constante de l'essai, il faut disposer de données antérieures adéquates relatives au système cellulaire utilisé.

1.4.1.2. Milieux et conditions de culture

On doit utiliser des milieux de culture et des conditions d'incubation appropriés (récipients de culture, température, concentration de CO_2 et humidité). Les milieux doivent être choisis en fonction des systèmes sélectifs et du type de cellules utilisés dans l'essai. Il est particulièrement important de choisir des conditions de culture qui assurent une croissance optimale des cellules pendant la période d'expression, ainsi que la capacité des cellules, tant mutantes que non mutantes, à former des colonies.

1.4.1.3. Préparation des cultures

Les cellules sont multipliées à partir de cultures souches,ensemencées dans le milieu de culture et incubées à 37°C. Avant l'emploi des cultures pour l'essai, il peut être nécessaire de les débarrasser des cellules mutantes qu'elles contiennent.

1.4.1.4. Activation métabolique

Les cellules doivent être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus couramment utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur (S9), préparée à partir de foie de rongeur traité avec des inducteurs enzymatiques, par exemple Aroclor 1254 (15, 16, 17, 18) ou un mélange de phénobarbital et de β -naphthoflavone (19, 20).

La fraction post-mitochondriale est généralement utilisée à une concentration comprise entre 1 et 10 % v/v dans le milieu final. Le choix du système d'activation métabolique peut dépendre de la classe chimique de la substance d'essai. Dans certains cas il peut y avoir avantage à utiliser plus d'une concentration de la fraction post-mitochondriale.

Plusieurs procédés nouveaux, comme la création de lignées cellulaires génétiquement modifiées exprimant des enzymes activantes spécifiques, sont susceptibles de fournir une activation endogène. Le choix des lignées cellulaires utilisées doit être justifié scientifiquement (par exemple par la pertinence de l'isoenzyme du cytochrome P450 pour le métabolisme de la substance d'essai).

1.4.1.5. Substance d'essai/préparation

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un solvant ou un véhicule approprié, puis éventuellement diluées avant le traitement des cellules. Les substances d'essai liquides peuvent être ajoutées directement ou après dilution au système d'essai. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2. Conditions expérimentales

1.4.2.1. Solvant/véhicule

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir chimiquement avec la substance d'essai ni altérer la survie des cellules et l'activité du mélange S9. L'emploi d'un solvant/véhicule inhabituel doit être justifié par des données faisant état de sa compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible. Dans les essais de substances qui sont instables dans l'eau, on utilisera des solvants organiques exempts d'eau. L'eau peut être enlevée à l'aide d'un tamis moléculaire.

1.4.2.2. *Concentration d'exposition*

La cytotoxicité, la solubilité dans le mélange d'essai final et les modifications de pH et d'osmolalité sont des critères à prendre en considération pour déterminer la dose la plus élevée à mettre en œuvre.

La cytotoxicité doit être mesurée, avec et sans système d'activation métabolique, dans l'expérience principale par un indicateur pertinent de l'intégrité et de la croissance cellulaire, tel que l'efficacité de clonage relative (taux de survie) ou la croissance totale relative. Il peut être utile de déterminer la cytotoxicité et la solubilité dans un essai préliminaire.

Il convient d'utiliser au moins quatre concentrations analysables. Dans le cas d'une substance cytotoxique, ces concentrations doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale, ce qui signifie généralement des concentrations séparées par un facteur compris entre 2 et $\sqrt{10}$ au maximum. Si la concentration la plus forte est basée sur la cytotoxicité, elle devrait donner un taux de survie relatif (efficacité de clonage relative) ou une croissance totale relative d'environ 10 à 20 % (mais non inférieure à 10 %). En ce qui concerne les substances relativement non cytotoxiques, la concentration maximale doit être la plus basse des trois concentrations suivantes : 5 $\mu\text{l/ml}$, 5 mg/ml ou 0,01 M.

Les substances relativement insolubles doivent être testées jusqu'à des concentrations égales ou supérieures à la limite de solubilité dans les conditions de culture. L'insolubilité doit être mise en évidence dans le milieu de traitement final auquel les cellules sont exposées. Il peut être utile d'évaluer la solubilité au début et à la fin du traitement, celle-ci pouvant varier au cours de l'exposition dans le système d'essai en raison de la présence de cellules, de S9, de sérum, etc. On conclut à l'insolubilité lorsqu'une précipitation est observée à l'œil nu. Le précipité ne doit pas interférer avec l'évaluation des résultats.

1.4.2.3. *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent être inclus dans chaque expérience avec et sans activation métabolique. Quand l'essai est effectué avec activation métabolique, la substance utilisée comme témoin doit être celle qui exige l'activation pour donner une réponse mutagène.

Des exemples de substances pouvant servir comme témoins positifs figurent dans le tableau ci-dessous.

Condition d'activation métabolique	Locus	Substance	N° CAS	N° Eines
Absence d'activation métabolique exogène	HPRT	Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
	TK (petites et grandes colonies)	Méthanesulfonate de méthyle	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
Ethylnitrosourée		759-73-9	212-072-2	
Présence d'activation métabolique exogène	HPRT	Méthyl-3 cholanthrène	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodiméthylamine	62-75-9	200-549-8
		Diméthyl-7,12 ben-zanthracène	57-97-6	200-359-5
	TK (petites et grandes colonies)	Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
		Monohydrate de cyclo-phosphamide	6055-19-2	
		Benzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5
		Méthyl-3 cholanthrène	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodiméthylamine (pour des niveaux élevés de S9)	62-75-9	200-549-8
		Benzo[a]pyrène	50-32-8	200-028-5

D'autres substances de référence appropriées peuvent être utilisées comme témoins positifs, par exemple la 5-bromo 2'-désoxyuridine (n° CAS 59-14-3, n° Eines 200-415-9) si le laboratoire possède des contrôles historiques relatifs à cette substance. L'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique doit être envisagé, s'ils sont disponibles.

Des témoins négatifs, constitués uniquement du solvant ou du véhicule dans le milieu de traitement et traités de la même façon que la substance d'essai, doivent être inclus. Il faut également inclure des témoins non traités, à moins que des essais antérieurs n'aient démontré que le solvant choisi n'a pas d'action délétère ou mutagène.

1.4.3. Mode opératoire

1.4.3.1. Traitement avec la substance d'essai

Les cellules en prolifération sont traitées avec la substance d'essai en présence et en l'absence d'activation métabolique. La durée d'exposition doit être suffisante (une durée de trois à six heures est généralement efficace) et peut s'étendre sur un ou plusieurs cycles cellulaires.

On peut réaliser les cultures en un seul ou en double exemplaire pour chaque concentration testée. Dans le cas des cultures en un seul exemplaire, il faut augmenter le nombre des concentrations afin d'assurer un nombre adéquat de cultures à analyser (par exemple, au moins huit concentrations analysables). Les cultures servant de témoins négatifs (solvant) sont faites en double.

Les substances gazeuses ou volatiles doivent être testées en utilisant des méthodes appropriées, par exemple dans des récipients de culture hermétiquement fermés (21, 22).

1.4.3.2. Détermination du taux de survie, de la viabilité et de la proportion de mutants

À la fin de la période d'exposition, les cellules sont lavées et mises en culture en vue de la détermination de leur taux de survie et de l'expression du phénotype mutant. La détermination de la cytotoxicité commence généralement après la période de traitement par la mesure de l'efficacité de clonage relative (taux de survie) ou de la croissance totale relative des cultures.

À chaque locus correspond un temps bien défini qui est nécessaire à l'expression presque optimale du phénotype des mutants nouvellement induits (HPRT et XPRT ont besoin d'au moins 6 à 8 jours et TK d'au moins 2 jours). Pour déterminer le nombre de mutants et l'efficacité de clonage, les cellules sont placées dans un milieu en présence et en l'absence d'agent(s) sélectif(s). On commence à mesurer la viabilité, qui permet de calculer la proportion de mutants, à la fin de la période d'expression en déposant les cultures dans un milieu non sélectif.

Si la substance d'essai est positive à l'essai sur L5178Y TK^{+/-}, la taille des colonies doit être déterminée dans au moins une des cultures traitées (à la concentration positive la plus élevée) et dans les témoins négatifs et positifs. Si la substance d'essai est négative à l'essai sur L5178Y TK^{+/-}, la taille des colonies doit être déterminée dans les témoins négatifs et positifs. Dans le cas des essais sur TK6TK^{+/-}, on peut également déterminer la taille des colonies.

2. RESULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RESULTATS

Les données doivent comprendre la détermination de la cytotoxicité et de la viabilité, le nombre de colonies et la proportion de mutants dans les cultures traitées et les cultures témoins. Dans le cas d'une réponse positive à l'essai sur L5178Y TK^{+/-}, on dénombre les colonies en distinguant les petites des grandes colonies pour au moins une concentration de la substance d'essai (concentration positive la plus élevée) et pour les témoins négatifs et positifs. La nature moléculaire et cytogénétique des deux sortes de colonies de mutants (petites et grandes) a été étudiée en détail (23, 24). Dans l'essai TK^{+/-}, les colonies sont recensées sur la base du critère de croissance normale (grandes colonies) et de croissance faible (petites colonies) (25). Les cellules mutantes qui ont subi les altérations génétiques les plus importantes ont un temps de duplication plus long et forment donc de petites colonies. Ces altérations vont de la perte du gène entier à des aberrations chromosomiques se manifestant dans le caryotype. L'induction de petites colonies de mutants a été mise en rapport avec des substances chimiques qui engendrent des aberrations chromosomiques importantes (26). Les cellules mutantes moins affectées croissent à des vitesses semblables à celles des cellules parentales et forment de grandes colonies.

Il convient d'indiquer le taux de survie (efficacité de clonage relative) ou la croissance totale relative. La proportion de mutants doit être exprimée comme le nombre de cellules mutantes divisé par le nombre de cellules survivantes.

Les données individuelles concernant chaque culture doivent être indiquées. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux.

Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse manifestement positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées.

Les résultats négatifs demandent à être confirmés cas par cas. Si la confirmation de résultats négatifs n'est pas jugée nécessaire, une justification doit être fournie. Pour les essais de confirmation effectués en cas de résultats négatifs ou équivoques, il convient d'envisager une modification des paramètres de l'étude, afin d'élargir la gamme des conditions évaluées. Les paramètres susceptibles d'être modifiés comprennent l'écart entre les doses et les conditions d'activation métabolique.

2.2. EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement dose-dépendant ou un accroissement reproductible de la proportion de mutants. En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas une conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs d'un essai in vitro de mutation génique sur cellules de mammifère indiquent que la substance d'essai induit des mutations géniques dans les cellules de mammifère des cultures utilisées. Une relation dose-réponse positive, si elle est reproductible, est des plus significatives. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance testée n'induit pas de mutation génique dans les cellules de mammifère des cultures utilisées.

3. RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Solvant/véhicule :

- justification du choix du véhicule/solvant,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Cellules :

- type et source des cellules,
- nombre de cultures,
- données concernant le cycle cellulaire,
- nombre de repiquages, le cas échéant,
- méthodes d'entretien des cultures cellulaires, le cas échéant,
- absence de mycoplasme, le cas échéant.

Conditions de l'essai :

- justification du choix des concentrations et du nombre de cultures, y compris des données relatives à la cytotoxicité et aux limites de solubilité, si elles sont disponibles,
- composition du milieu, concentration de CO₂,
- concentration de la substance d'essai,
- volume de véhicule et de substance d'essai ajouté,
- température d'incubation,
- temps d'incubation,
- durée du traitement,
- densité cellulaire pendant le traitement,
- type et composition du système d'activation métabolique, y compris les critères d'acceptabilité,
- témoins positifs et négatifs,
- durée de la période d'expression,
- agents sélectifs,
- critères pour conclure que les résultats des essais sont positifs, négatifs ou équivoques,
- méthodes utilisées pour compter le nombre de cellules viables et de cellules mutantes,
- définition de colonies qui sont prises en compte pour le type et pour la taille, y compris les critères pour les « petites » et « grandes » colonies.

Résultats :

- signes de toxicité,
- signes de précipitation,
- données sur le pH et l'osmolalité pendant l'exposition à la substance d'essai, si elles ont été déterminées,
- taille des colonies si elle a été déterminée pour au moins les témoins négatifs et positifs,
- aptitude du laboratoire à déceler des mutants en petites colonies avec le système L5178Y TK^{+/−}, le cas échéant,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données concernant les témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs concomitants,
- données concernant les témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes, écarts-types).
- proportion de mutants.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Moore, M.M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (eds.) (1987), Banbury Report 28 : Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E. H. Y. and Malling, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells In Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, pp. 1306-1312.
- (3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, Mutation Res., 94, pp. 467-485.
- (4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, Mutagenesis, 4, pp. 394-403.
- (5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays : Evaluation of Six Drug Candidates, Mutation Res., 223, pp. 121-128.
- (6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and 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, pp.235-239.
- (7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res., 257, pp. 147-204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 115, pp. 225-251.
- (9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and 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. Environment Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 196, pp. 17-36.
- (10) 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. and 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, pp. 135-141.
- (11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and 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, pp. 9-17.
- (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells, Mutation Res., 160, pp. 133-147.
- (13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/TK⁺/⁻ TK⁺/⁻ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in : Kilbey, B. J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
- (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in : Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, Mutation Res., 46, pp. 365-373.
- (16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.
- (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK⁺/⁻ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, Mutat Res., 59, pp. 61-108.
- (18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, pp. 173-215.
- (19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcome, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and 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. and Philpot, R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooney, 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.
- (22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and 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, pp. 795-801.
- (23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, pp. 51-55.
- (24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^r) and Mutants of L5178Y/TK⁺/⁻ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res, 151, pp. 161-174.
- (25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, Mutation Res., 229, pp. 89-102.
- (26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK⁺/⁻ — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, Mutagenesis 5, pp. 609-614. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 11 juillet 2001.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,

Mme M. AELVOET

Annexe I F

« B.23. ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR SPERMATOGONIES DE MAMMIFÈRE

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 483, Essai d'aberration chromosomique sur des spermatogonies de mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai in vivo d'aberration chromosomique sur spermatogonies de mammifère est destiné à détecter les substances qui causent des aberrations de structure dans les spermatogonies de mammifère (1, 2, 3, 4, 5). Les aberrations de structure peuvent être de deux types : chromosomiques ou chromatidiennes. La majorité des mutagènes chimiques induisent des mutations chromatidiennes, mais des aberrations chromosomiques se produisent également. Cet essai n'est pas conçu pour évaluer les aberrations de nombre et n'est pas utilisé systématiquement dans ce but. Les mutations chromosomiques et les événements liés sont à l'origine de nombreuses maladies génétiques humaines.

Cet essai évalue des atteintes chromosomiques qui surviennent dans les spermatogonies et devrait par conséquent permettre de prévoir l'introduction de mutations transmissibles à la descendance dans les cellules germinales.

Pour cet essai, on utilise généralement des rongeurs. Cet essai cytogénétique in vivo détecte des aberrations chromosomiques dans les spermatogonies en mitose. D'autres cellules cibles ne font pas l'objet de cette méthode.

Afin de détecter des aberrations chromatidiennes dans les spermatogonies, il faut examiner la première division cellulaire mitotique après le traitement, avant que ces aberrations ne disparaissent lors des divisions cellulaires ultérieures. L'analyse de chromosomes méiotiques peut fournir des informations complémentaires utiles; elle est destinée à mettre en évidence des aberrations de type chromosomique aux stades de la diacinèse-métaphase I, lorsque les cellules traitées se transforment en spermatocytes.

Cet essai in vivo est conçu pour vérifier si les mutagènes actifs sur les cellules somatiques le sont également sur les cellules germinales. L'essai sur spermatogonies se prête particulièrement bien à l'évaluation du risque mutagène, puisqu'il permet de tenir compte de facteurs de métabolisme in vivo, de pharmacocinétique et de processus de réparation de l'ADN.

Les testicules contiennent plusieurs générations de spermatogonies présentant des sensibilités diverses au traitement chimique. De ce fait, les aberrations détectées représentent une réponse globale des populations de spermatogonies traitées, dans lesquelles les cellules différenciées, plus nombreuses, prédominent. En fonction de leur position dans le testicule, les différentes générations de spermatogonies sont ou non exposées aux substances présentes dans la circulation générale en raison de la barrière physique et physiologique des cellules de Sertoli et de la barrière sang-testicule.

L'utilisation de cet essai ne convient pas s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DEFINITIONS

Aberration de type chromatidien : lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure d'une seule chromatide ou par une cassure et une réunion entre chromatides.

Aberration de type chromosomique : lésion chromosomique de structure se traduisant par une cassure, ou par une cassure et une réunion, des deux chromatides sur le même site.

Lacune : une lésion achromatique inférieure à la largeur d'une chromatide, avec un défaut d'alignement minimal des chromatides.

Aberration de nombre : une modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des cellules employées.

Polypléidie : état multiple du nombre de chromosomes haploïdes (n), autre que la diploïdie (c'est-à-dire 3n, 4n, etc.)

Aberration de structure : modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope au stade de la métaphase et se présentant sous la forme de délétions, de cassures, de modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

1.3. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Les animaux sont exposés à la substance d'essai par une voie d'exposition appropriée et sont sacrifiés à des moments appropriés après le traitement. Avant le sacrifice, les animaux sont traités avec une substance qui bloque les cellules en métaphase (par exemple la colchicine ou Colcemid®). Ensuite, les préparations chromosomiques réalisées à partir des cellules germinales sont colorées et les cellules en métaphase sont examinées pour mettre en évidence les aberrations chromosomiques.

1.4. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.4.1. Préparations

1.4.1.1. *Sélection des espèces animales*

On utilise communément des hamsters chinois et des souris. Des mâles d'autres espèces de mammifères appropriées peuvent cependant être employés. Il convient d'utiliser des animaux adultes jeunes et sains, issus de souches de laboratoire courantes. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne doit pas excéder $\pm 20\%$ du poids moyen.

1.4.1.2. *Conditions d'encagement et régime alimentaire*

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60 %.

1.4.1.3. *Préparation des animaux*

De jeunes mâles sains sont répartis par randomisation entre les groupes témoins et les groupes traités. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement. Les animaux sont identifiés individuellement. Ils sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours.

1.4.1.4. *Préparation des doses*

Les substances d'essai solides sont dissoutes ou mises en suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant l'administration aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

1.4.2. Conditions expérimentales

1.4.2.1. *Solvant/véhicule*

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données sur leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un véhicule/solvant aqueux, chaque fois que cela est possible.

1.4.2.2. *Témoins*

Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent accompagner chaque essai. Les animaux des groupes témoins doivent être manipulés exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent produire des aberrations chromosomiques de structure *in vivo* dans les spermatogonies lorsqu'ils sont administrés à des niveaux d'exposition supposés produire un accroissement détectable par rapport au bruit de fond.

Les doses de témoin positif doivent être choisies afin que les effets soient nets mais que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examineur. Le témoin positif peut être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai et un seul prélèvement d'échantillon peut suffire. L'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'ils sont disponibles. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Substance	N° CAS	N° Einecs
Cyclophosphamide Monohydrate de cyclophosphamide	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Cyclohexylamine	108-91-8	203-629-0
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Acrylamide monomère	79-06-1	201-173-7
Triéthylènemélatamine	51-18-3	200-083-5

Lors de chaque prélèvement, il faut inclure un lot d'animaux témoins négatifs traités seulement avec le solvant ou le véhicule et par ailleurs manipulés de la même façon que les groupes traités. Ceci peut être évité si l'on dispose de données acceptables sur la variabilité interindividuelle et la fréquence spontanée de cellules comportant des aberrations chromosomiques provenant de témoins historiques. En outre, des témoins non traités doivent aussi être inclus, à moins que des données historiques ne démontrent que le solvant/véhicule choisi n'induit aucun effet délétère ou mutagène.

1.5. MODE OPERATOIRE

1.5.1. Nombre d'animaux

Chaque groupe traité et groupe témoin doit comporter au moins cinq mâles analysables.

1.5.2. Modalités de traitement

La substance d'essai est de préférence administrée en une seule fois ou en deux fois (c'est-à-dire en un seul ou deux traitements). Elle peut aussi être administrée en doses fractionnées (deux doses le même jour avec un intervalle de quelques heures au maximum) afin que l'administration d'un grand volume soit plus aisée. D'autres modalités de traitement doivent être scientifiquement justifiées.

Dans le groupe qui reçoit la dose la plus forte, deux prélèvements d'échantillons sont effectués après le traitement. La cinétique cellulaire pouvant être influencée par la substance d'essai, le premier et le deuxième prélèvement ont lieu respectivement environ 24 heures et 48 heures après le traitement. Pour les autres doses, le prélèvement est effectué après 24 heures ou 1,5 cycle cellulaire après le traitement, à moins que l'on sache qu'il existe un autre délai de prélèvement plus propice à la détection des effets (6).

D'autres temps de prélèvement peuvent être employés. Par exemple, dans le cas de substances chimiques qui pourraient induire des chromosomes retardataires ou d'avoir des effets indépendants de la phase S, il peut être judicieux d'effectuer des prélèvements plus précoces (1).

La pertinence d'un traitement répété doit être évaluée au cas par cas. Après un traitement répété, les animaux doivent être sacrifiés 24 heures (1,5 cycle cellulaire) après le dernier traitement. De plus, d'autres temps de prélèvements peuvent être employés si nécessaire.

Avant d'être sacrifiés, les animaux reçoivent une dose appropriée d'un agent bloquant la métaphase (par exemple du Colcemid® ou de la colchicine) par injection intrapéritonéale. Les échantillons sont prélevés après des délais appropriés. Ce délai est d'environ 3-5 heures pour la souris et de 4-5 heures environ pour le hamster chinois.

1.5.3. Niveaux de dose

Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose requis, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et les mêmes modalités de traitement que ceux de l'étude principale (7). En cas de toxicité, on utilise trois niveaux de dose pour le premier prélèvement. Ces niveaux de dose doivent couvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou légère à la toxicité maximale. Pour les prélèvements suivants, seule la dose la plus élevée est utilisée.

Celle-ci est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées suivant la même modalité de traitement, seraient létales.

Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées cas par cas. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans les spermatogonies (par exemple une diminution des mitoses des spermatogonies par rapport à la première et la deuxième métaphase méiotique; cette diminution ne devrait pas dépasser 50 %).

1.5.4. Test limite

Si un essai réalisé avec au moins 2 000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète avec trois niveaux de doses n'est pas nécessaire. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans le test limite.

1.5.5. Voies d'administration

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation adaptée, ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6. Préparation des chromosomes

Des suspensions cellulaires obtenues à partir d'un ou des deux testicules immédiatement après le sacrifice sont exposées à une solution hypotonique et fixées. Les cellules sont ensuite étalées sur des lames et colorées.

1.5.7. Analyse

Au moins 100 cellules en métaphase bien étalées sont analysées par animal (soit un minimum de 500 métaphases par groupe d'essai). Ce nombre peut être réduit lorsque les aberrations observées sont nombreuses.

Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope. Le procédé de fixation provoquant souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase, ce qui entraîne une perte de chromosomes, les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal à $2n \pm 2$.

2. RESULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RESULTATS

Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Le nombre de cellules présentant une ou plusieurs aberrations de structure et le nombre d'aberrations par cellule doivent être évalués pour chaque animal. Les différents types d'aberrations chromosomiques de structure doivent être consignés avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes traités et témoins. Les lacunes sont enregistrées séparément et rapportées mais ne sont généralement pas incluses dans la fréquence totale des aberrations.

Pour les cellules en méiose, il conviendra de prendre comme élément de cytotoxicité le rapport du nombre de spermatogonies en métaphase de première mitose/nombre de spermatogonies en métaphase de seconde mitose. Cette analyse sera réalisée à la fois chez les animaux traités et les contrôles négatifs sur un échantillon de 100 cellules en division pour chaque animal. Dans le cas où seules des mitoses sont observées, l'index mitotique doit être déterminé dans au moins 1 000 cellules de chaque animal.

2.2. EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement, dose-dépendant, du nombre relatif de cellules présentant des aberrations ou une augmentation nette du nombre de cellules présentant des aberrations dans un seul groupe traité à un seul moment de prélèvement. En premier lieu, il s'agit de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (8) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur décisif pour conclure à une réponse positive. Les résultats équivoques doivent être clarifiés par des essais supplémentaires réalisés de préférence dans des conditions expérimentales modifiées.

Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères indiqués ci-dessus, on peut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance étudiée.

Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Des résultats positifs obtenus dans cet essai *in vivo* d'aberration chromosomique sur spermatogonies indiquent que la substance induit des aberrations chromosomiques dans les cellules germinales de l'espèce testée. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance testée n'induit pas d'aberrations chromosomiques dans les cellules germinales de l'espèce testée.

Le fait que la substance d'essai ou ses métabolites n'atteignent pas le tissu cible devrait être discuté.

3. RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Solvant/véhicule :

- justification du choix du véhicule,
- solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience :

- espèce/souche utilisée,
- nombre et âge des animaux,
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids individuels des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales :

- résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,
- justification du choix des doses employées,
- justification du choix de la voie d'administration,
- détails concernant la préparation de la substance d'essai,
- détails concernant l'administration de la substance d'essai,
- justification du choix des moments de sacrifice,
- conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai 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 modalités de traitement et de prélèvement,
- méthodes de mesure de la toxicité,
- nature et concentration de l'inhibiteur du fuseau mitotique et durée du traitement,
- méthodes de préparation des lames,
- critères de dénombrement des aberrations,
- nombre de cellules analysées par animal,
- critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats :

- signes de toxicité,
- index mitotique,
- taux de mitoses des spermatogonies par rapport à la première et la deuxième métaphase méiotique,
- type et nombre d'aberrations, séparément pour chaque animal,
- nombre total d'aberrations par groupe,
- nombre de cellules présentant des aberrations par groupe,
- relation dose-réponse, si possible,
- analyses statistiques, le cas échéant,
- données sur les témoins négatifs concomitants,
- données sur les témoins négatifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types),
- données sur les témoins positifs concomitants,
- changements de la ploïdie, le cas échéant.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. BIBLIOGRAPHIE

- (1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in : Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B : Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
- (2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in : Mutagenicity Testing : a Practical Approach, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, Cytogenetics and Cell Genetics, 3, pp. 289-294.
- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), In Vivo Cytogenetic Assays, in : D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res., 52, pp. 207-209.
- (6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, Mutation Res., 312, pp. 313-318.
- (7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group : Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.
- (8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in : D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 11 juillet 2001.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,
Mme M. AELVOET

—4—

Annexe I G

« B.39. ESSAI IN VIVO DE SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) SUR CELLULES HÉPATIQUES DE MAMMIFÈRE

1. METHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCDE TG 486, Essai in vivo de synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur cellules hépatiques de mammifères (1997).

1.1. INTRODUCTION

L'essai in vivo de synthèse non programmée de l'ADN (unscheduled DNA synthesis, UDS) sur cellules hépatiques de mammifère est destiné à identifier les substances qui induisent la réparation de l'ADN dans les cellules hépatiques des animaux traités (1, 2, 3, 4).

Cet essai in vivo constitue une méthode d'étude des effets génotoxiques des substances chimiques dans le foie.

L'effet mesuré témoigne de l'altération de l'ADN et de la réparation qui en résulte dans les cellules hépatiques. Comme le foie est généralement le principal site du métabolisme des substances absorbées, il constitue un site approprié pour la détermination in vivo des altérations de l'ADN.

Il ne faut pas avoir recours à cet essai s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindra pas le tissu cible.

La synthèse non programmée de l'ADN (UDS) est mesurée en déterminant l'incorporation de nucléosides marqués dans les cellules qui ne subissent pas une synthèse programmée (phase S) de l'ADN. La technique la plus couramment utilisée est la détermination par autoradiographie de l'incorporation de thymidine marquée au

tritium (³H-TdR). On utilise de préférence le foie de rat pour les essais UDS in vivo. D'autres tissus peuvent être utilisés mais ne font pas l'objet de cette méthode.

La détection d'une UDS dépend du nombre de bases d'ADN excisées et remplacées au site de l'altération.

Ainsi, l'essai UDS est particulièrement utile pour détecter la réparation de longues séquences (20-30 bases) induite par la substance. Par contre, la réparation de courtes séquences (1-3 bases) est détectée avec une sensibilité beaucoup plus faible. En outre, des événements mutagènes peuvent résulter d'une non-réparation, d'une réparation erronée d'altérations de l'ADN ou d'une répllication erronée. L'ampleur de l'UDS ne fournit aucune indication quant à la fidélité du processus de réparation. D'autre part, il est possible qu'un mutagène réagisse avec l'ADN sans que l'altération de celui-ci soit réparée par un processus de réparation par excision. Le fait que l'essai UDS ne fournit pas d'informations spécifiques sur l'activité mutagène est compensé par la sensibilité potentielle de ce critère parce qu'il est mesuré dans la totalité du génome.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. DEFINITIONS

Cellules en réparation : nombre net de grains (NNG) supérieur à une valeur préétablie à justifier par le laboratoire effectuant l'essai.

Nombre net de grains (NNG) : mesure quantitative de l'activité UDS de cellules lors d'essais UDS autoradiographiques; calculé en soustrayant du nombre de grains nucléaires (GN) le nombre moyen de grains cytoplasmiques dans des zones cytoplasmiques équivalentes au noyau (GC) : $NNG = GN - GC$. Les NNG sont calculés pour les cellules individuelles, puis regroupés pour les cellules d'une culture, de cultures parallèles, etc.

Synthèse réparatrice de l'ADN (UDS) : synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant une région lésée par des substances chimiques ou physiques.

1.3. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

L'essai UDS in vivo sur cellules hépatiques de mammifère indique une synthèse de réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant une région altérée par des substances chimiques ou physiques. L'essai repose généralement sur l'incorporation de ^3H -TdR dans l'ADN de cellules hépatiques qui présentent une faible fréquence de cellules dans la phase S du cycle cellulaire. L'incorporation de ^3H -TdR est généralement déterminée par autoradiographie dans la mesure où cette technique n'est pas sensible aux interférences dues aux cellules en phase S comme c'est le cas du comptage en scintillation liquide, par exemple.

1.4. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.4.1. Préparations

1.4.1.1. Sélection de l'espèce animale

Le rat est communément utilisé, 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 couramment utilisées en laboratoire. Au début de l'étude, la différence pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser $\pm 20\%$ du poids moyen de chaque sexe.

1.4.1.2. Conditions d'encagement et régime alimentaire

Les conditions générales décrites dans l'introduction générale de la partie B sont appliquées mais le taux d'humidité devrait se situer aux environs de 50-60 %.

1.4.1.3. Préparation des animaux

De jeunes adultes sains sont répartis par randomisation entre les groupes des animaux témoins et traités. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effet dû à leur emplacement. Ils sont identifiés individuellement. Ils sont gardés dans leur cage pendant au moins cinq jours avant le début de l'étude, de façon à les acclimater aux conditions du laboratoire.

1.4.1.4. Substance d'essai/préparation

Les substances d'essai solides sont préparées par dissolution ou suspension dans un véhicule ou un solvant approprié, puis éventuellement diluées avant l'administration aux animaux. Les substances d'essai liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il convient d'utiliser des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les domaines du stockage.

1.4.2. Conditions expérimentales

1.4.2.1. Solvant/véhicule

Le solvant/véhicule choisi ne doit pas avoir d'effet toxique aux doses utilisées ni présenter de réaction chimique avec la substance d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données faisant état de leur compatibilité. On préconise d'envisager d'abord l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux, chaque fois que cela est possible.

1.4.2.2. Témoins

Des témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule) doivent être inclus dans chaque partie indépendante de l'expérience. Les animaux des groupes témoins sont traités exactement comme ceux des groupes traités, mise à part l'administration de la substance d'essai.

Les témoins positifs doivent être des substances dont on sait qu'elles produisent une UDS à des niveaux d'exposition supposés conduire à un accroissement détectable par rapport au bruit de fond. Les témoins positifs pour lesquels une activation métabolique est nécessaire doivent être utilisés à des doses qui donnent lieu à une réponse modérée (4). Les doses peuvent être choisies de façon que les effets soient évidents et que l'identité des lames codées ne soit pas révélée immédiatement à l'examineur. Les substances indiquées dans le tableau ci-dessous sont des exemples de témoins positifs.

Moment de prélèvement	Substance	N° CAS	N° Einecs
Précoce (2-4 heures)	N-nitrosodiméthylamine	62-75-9	200-249-8
Tardif (12-16 heures)	N-2-fluorénylacétamide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

D'autres témoins positifs appropriés peuvent être utilisés. Le témoin positif doit être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai.

1.5. MODE OPERATOIRE

1.5.1. Nombre et sexe des animaux

Il convient d'utiliser un nombre adéquat d'animaux afin de tenir compte de variations interindividuelles de la réponse à l'essai. Il doit y avoir au moins 3 animaux analysables par groupe. Lorsqu'on dispose d'une importante quantité de données historiques, les groupes témoins négatifs et positifs peuvent ne comprendre que 1 ou 2 animaux.

Si, au moment de l'étude, on dispose de données historiques effectuées avec la même espèce et ayant utilisé la même voie d'administration, qui démontrent l'absence de différence importante de toxicité entre sexes, on peut effectuer l'essai avec des animaux d'un seul sexe, de préférence des mâles. Si l'exposition humaine est spécifique du sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés pour l'essai.

1.5.2. Modalité de traitement

Les substances d'essai sont généralement administrées en une seule fois.

1.5.3. Niveaux de dose

Normalement, on utilise au moins deux niveaux de dose. La dose la plus élevée est définie comme la dose qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées suivant les mêmes modalités, seraient létales. En général, la dose la plus faible est comprise entre la moitié et le quart de la dose la plus forte.

Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception à ces critères d'établissement de doses et doivent être évaluées cas par cas. Si une étude préliminaire est réalisée afin d'évaluer les niveaux de dose, cette étude doit être effectuée dans le même laboratoire en utilisant la même espèce, la même souche, des animaux du même sexe et la même modalité de traitement que ceux de l'étude principale.

La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans le foie (noyaux pycnotiques, par exemple).

1.5.4. Test limite

Si un essai réalisé avec au moins 2 000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si une génotoxicité est improbable d'après les données relatives à des substances de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète n'est pas nécessaire. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable, on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans l'essai de dose limite.

1.5.5. Voies d'administration

La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation adaptée. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. La voie péritonéale n'est toutefois pas recommandée, étant donné qu'elle peut conduire à une exposition directe du foie à la substance d'essai plutôt que par l'intermédiaire du système circulatoire. Le volume maximal de liquide administré en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne devrait pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

1.5.6. Préparation des cellules hépatiques

Les cellules hépatiques des animaux traités sont normalement préparées 12-16 heures après le traitement. Un prélèvement supplémentaire effectué plus tôt (normalement 2-4 heures après le traitement) est en général nécessaire, à moins qu'il y ait une réponse manifestement positive après 12-16 heures. Toutefois, d'autres délais de prélèvement peuvent être utilisés s'ils sont justifiés sur la base de données toxicocinétiques.

Les cultures à court terme de cellules hépatiques de mammifère sont habituellement établies en perfusant le foie in situ avec la collagénase et en laissant les cellules fraîchement dissociées se fixer sur une surface appropriée. Les cellules hépatiques des témoins négatifs doivent présenter une viabilité (5) d'au moins 50 pour cent.

1.5.7. Détermination de l'UDS

Les cellules hépatiques de mammifère fraîchement isolées sont généralement incubées dans un milieu contenant du $^3\text{H-TdR}$ pendant une durée appropriée (3-8 heures, par exemple). À la fin de la période d'incubation, le milieu est enlevé des cellules, qui peuvent ensuite être incubées avec un milieu contenant un excès de thymidine non marquée, afin de réduire la radioactivité non incorporée (« cold chase »). Les cellules sont ensuite rincées, fixées et séchées. Pour les périodes d'incubation plus longues, la « cold chase » n'est pas absolument nécessaire. Les lames sont plongées dans une émulsion autoradiographique, maintenues dans l'obscurité (réfrigérées pendant 7-14 jours, par exemple), développées et colorées. On procède ensuite au comptage des grains d'argent. On prépare deux à trois lames pour chaque animal.

1.5.8. Analyse

Les préparations sur lame doivent contenir un nombre suffisant de cellules de morphologie normale pour qu'une évaluation probante de l'UDS soit possible. Les préparations sont examinées au microscope en vue de la recherche de signes de cytotoxicité manifeste (pycnose, diminution du niveau de marquage radioactif, par exemple).

Les lames doivent être codées avant le comptage des grains. On analyse normalement 100 cellules de chaque animal sur au moins deux lames; l'analyse d'un nombre inférieur à 100 cellules/animal doit être justifié. Le nombre de grains n'est pas déterminé pour les noyaux en phase S, mais la proportion de cellules en phase S peut être enregistrée.

Le niveau d'incorporation de $^3\text{H-TdR}$ dans le noyau et le cytoplasme des cellules morphologiquement normales, tel qu'il est mis en évidence par le dépôt de grains d'argent, doit être déterminé à l'aide de méthodes appropriées.

Le nombre de grains est déterminé au niveau du noyau (grains nucléaires, GN) et des zones du cytoplasme équivalentes au noyau (grains cytoplasmiques, GC). Le nombre de GC est déterminé sur la base soit de la région du cytoplasme la plus fortement marquée, soit de la moyenne de deux ou trois régions proches du noyau choisies au hasard. D'autres méthodes de comptage (cellules entières, par exemple) peuvent être utilisées si on peut les justifier (6).

2. RESULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RESULTATS

Les données doivent être indiquées individuellement pour chaque culture. En outre, toutes les données doivent être résumées sous forme de tableaux. Le nombre net de grains (NNG) doit être déterminé pour chaque cellule, chaque animal, chaque dose et chaque temps de prélèvement en soustrayant le nombre de GC du nombre de GN. Si des « cellules en réparation » sont comptées, les critères pour définir les « cellules en réparation » doivent être justifiés et se fonder sur des données historiques ou sur des témoins négatifs concomitants. Les résultats numériques peuvent être évalués à l'aide de méthodes statistiques. Dans ce cas, il faut choisir et justifier les tests statistiques avant la réalisation de l'étude.

2.2. EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Exemples de critères permettant de conclure à une réponse positive ou négative :

positive	i)	valeur NNG supérieure à un seuil préétabli justifié sur la base des données historiques du laboratoire,
ou	ii)	valeur NNG significativement supérieure à celle du témoin concomitant,
négative	i)	valeur NNG inférieure ou égale au seuil des contrôles historiques,
ou	ii)	valeur NNG non significativement supérieure à celle du témoin concomitant.

Il convient de prendre en considération la pertinence biologique des données (paramètres tels que la variation interindividuelle, 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 décisif pour conclure à une réponse positive.

Bien que la plupart des essais donneront des résultats nettement positifs ou négatifs, dans certains cas rares l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas une conclusion catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester équivoques ou discutables indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

Un résultat positif à l'essai UDS in vivo sur cellules hépatiques de mammifère indique que la substance d'essai induit des altérations de l'ADN dans les cellules hépatiques de mammifère in vivo qui peuvent être réparées par la synthèse non programmée de l'ADN in vitro. Un résultat négatif signifie que, dans les conditions de l'essai, la substance d'essai n'induit pas d'altération de l'ADN détectable par cet essai.

Le fait que la substance d'essai atteigne la circulation générale ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systémique) devrait être discutée.

3. RAPPORT

RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

Solvant/véhicule :

— justification du choix du véhicule,

— solubilité et stabilité de la substance d'essai dans le solvant/véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience :

- espèce/souche utilisée,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc.,
- poids individuels des animaux au début de l'essai, y compris l'intervalle des poids, la moyenne et l'écart-type dans chaque groupe.

Conditions expérimentales :

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule),
- résultats de l'étude de détermination des doses utiles, si elle a été réalisée,
- justification du choix des doses employées,
- détails concernant la préparation 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 la circulation générale ou le tissu cible, le cas échéant,
- conversion de la concentration (ppm) de la substance d'essai 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 modalités de traitement et de prélèvement,
- méthodes de mesure de la toxicité,
- méthode de préparation et de culture des cellules hépatiques,
- technique autoradiographique utilisée,
- nombre de lames préparées et nombre de cellules analysées,
- critères d'évaluation,
- critères de décision concernant les résultats positifs, négatifs et équivoques.

Résultats :

- valeurs moyennes du nombre de grains nucléaires, du nombre de grains cytoplasmiques et du nombre net de grains pour chaque lame, animal et groupe,
- relation dose-réponse, si possible,
- évaluation statistique, le cas échéant,
- signes de toxicité,
- données sur les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs concomitants,
- données sur les témoins négatifs (solvant/véhicule) et positifs antérieurs (étendues, moyennes et écarts-types),
- nombre de « cellules en réparation », s'il a été déterminé,
- nombre de cellules en phase S, s'il a été déterminé,
- viabilité des cellules.

Discussion des résultats.

Conclusions.

4. 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, pp. 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, pp. 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. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, *Mutations Res.*, 312, pp. 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, pp. 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, pp. 553-562. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 11 juillet 2001.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,
Mme M. AELVOET

Annexe II

« ANNEXE IX

PARTIE A

Dispositions relatives aux fermetures de sécurité pour les enfants

Outre les dispositions de l'article 7, paragraphe 1, point e), de l'arrêté, tout récipient, quelle que soit sa capacité, contenant des substances qui présentent un danger en cas d'aspiration (Xn; R65) et qui sont classées et étiquetées conformément au point 3.2.3 de l'annexe VI de l'arrêté à l'exception des substances placées sur le marché sous forme d'aérosols ou dans des récipients munis d'un dispositif scellé de pulvérisation, doit être muni d'une fermeture de sécurité pour les enfants.

1. Emballages refermables

Les fermetures de sécurité pour les enfants utilisées sur des emballages refermables doivent correspondre à la norme ISO 8317 (édition du 1^{er} juillet 1989) relative aux « Emballages à l'épreuve des enfants — Exigences et méthodes d'essai pour emballages refermables », adoptée par l'Organisation internationale de normalisation (ISO).

2. Emballages non refermables

Les fermetures de sécurité pour les enfants utilisées sur des emballages non refermables doivent correspondre à la norme européenne EN 862 (édition de mars 1997) relative aux « Emballages — emballages à l'épreuve des enfants — exigences et méthodes d'essai pour emballages non refermables de produits non pharmaceutiques », adoptée par le Comité européen de normalisation (CEN).

3. Remarques

1. Seuls les laboratoires ayant prouvé qu'ils satisfont aux normes européennes EN série 45000 sont autorisés à certifier la conformité aux normes indiquées ci-dessus.

2. Cas particuliers

S'il semble évident qu'un emballage est suffisamment sûr pour les enfants parce que ceux-ci ne peuvent avoir accès à son contenu sans l'aide d'un outil, l'essai peut ne pas être effectué.

Dans tous les autres cas et lorsqu'elle a des raisons valablement justifiées de douter de l'efficacité de la fermeture de sécurité pour les enfants utilisée, l'autorité nationale peut demander au responsable de la mise sur le marché de lui fournir une attestation délivrée par un laboratoire défini au point 3.1 certifiant :

— que le type de fermeture utilisé est tel qu'il ne nécessite pas d'essais selon les normes ISO et CEN mentionnées ci-dessus

ou

— que la fermeture visée a été soumise aux essais prévus par la norme mentionnée ci-dessus et est conforme aux prescriptions imposées.

PARTIE B

Dispositions relatives aux dispositifs permettant de détecter les dangers au toucher

Les prescriptions techniques concernant les dispositifs permettant la détection des dangers au toucher doivent être conformes à la norme EN ISO 11683 (édition de 1997) relative aux « Emballages — Indications tactiles de danger — Exigences ».

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 11 juillet 2001.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la Consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,
Mme M. AELVOET

Bijlage IA

« B.10. MUTAGENITEIT - IN VITROTEST OP CHROMOSOOMAFWIJINGEN IN ZOOGDIERCELLEN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG473 van de OESO : In-vitrotest op chromosoomafwijkingen in zoogdiercellen (1997).

1.1. INLEIDING

De in-vitrotest op chromosoomafwijkingen is bedoeld om te bepalen welke stoffen structurele chromosoomafwijkingen bij gekweekte menselijke cellen veroorzaken (1) (2) (3). Er zijn twee soorten structurele afwijkingen : het chromosoomtype en het chromatidetype. De meeste chemische mutagenen veroorzaken afwijkingen van het chromatidetype, maar ook het chromosoomtype komt voor. Een toename van polyploidie kan erop wijzen dat een chemische stof numerieke afwijkingen kan veroorzaken. Deze methode is echter niet opgezet om numerieke afwijkingen te meten en wordt normaal gesproken niet voor dat doel gebruikt. Chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens en het lijkt er sterk op dat chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen die veranderingen in oncogenen en tumorsuppressorgenen van somatische cellen veroorzaken, betrokken zijn bij de inductie van kanker bij de mens en bij proefdieren.

Bij de in-vitrotest op chromosoomafwijkingen kunnen culturen van permanente cellijnen, celstammen of primaire celculturen worden gebruikt. De gebruikte cellen worden geselecteerd op basis van het groeivermogen in een cultuur, de stabiliteit van het karyotype, het aantal chromosomen, de verscheidenheid van de chromosomen en de frequentie van spontane chromosoomafwijkingen.

Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Dit metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in een zoogdiercel in vivo niet volledig nabootsen. Er moet goed op worden gelet dat omstandigheden die kunnen leiden tot positieve resultaten die niet het gevolg zijn van intrinsieke mutageniteit maar door veranderingen in de pH of de osmolaliteit of een sterke cytotoxiciteit worden veroorzaakt, worden vermeden (4) (5).

Deze test wordt gebruikt voor de screening op mogelijke mutagenen en carcinogenen voor zoogdieren. Veel stoffen die positief op deze test reageren, zijn carcinogeen voor zoogdieren, maar er is geen absolute correlatie tussen deze test en carcinogeniteit. De correlatie is afhankelijk van de chemische klasse en het lijkt er steeds meer op dat er carcinogenen zijn die met deze test worden gesignaleerd omdat ze blijkbaar via andere mechanismen dan directe DNA-beschadiging werken.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Afwijking van het chromatidetype : structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in individuele chromatiden ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Afwijking van het chromosoomtype : structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in beide chromatiden op dezelfde plaats ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Endoreduplicatie : een proces waarbij de kern na een S-fase met DNA-replicatie niet tot mitose overgaat, maar opnieuw een S-fase begint. Het resultaat is chromosomen met 4, 8, 16, ... chromatiden.

Hiaat : een achromatische beschadiging die kleiner is dan de breedte van één chromatide en waarbij de fout in de uitlijning van de chromatiden minimaal is.

Mitotische index : de verhouding tussen het aantal cellen in de metafase en het totale aantal cellen in een populatie; deze index geeft een indicatie van de snelheid waarmee deze populatie zich voortplant.

Numerieke afwijking : een verandering in het aantal chromosomen ten opzichte van het normale aantal dat kenmerkend is voor de gebruikte cellen.

Polyploidie : het voorkomen van een ander veelvoud van het haploïde aantal chromosomen (n) dan het diploïde aantal (d.w.z. 3n, 4n, enz.).

Structurele afwijking : een verandering in de chromosoomstructuur die bij microscopisch onderzoek tijdens de metafase van de celdeling kan worden waargenomen in de vorm van deleties, fragmenten en intra- of interchromosomale uitwisselingen.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Celculturen worden zowel met als zonder metabole activering aan de teststof blootgesteld. Op vooraf bepaalde tijdstippen na de blootstelling van de celculturen aan de teststof worden ze met een metafasestopper (bv. Colcemid® of colchicine) behandeld, geoogst en gekleurd en worden de cellen in de metafase microscopisch onderzocht op de aanwezigheid van chromosoomafwijkingen.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. Voorbereiding

1.4.1.1. Cellen

Er kunnen verschillende soorten cellijnen, stammen of primaire celculturen worden gebruikt, waaronder ook menselijke cellen (bv. fibroblasten van Chinese hamsters of menselijke of van andere zoogdieren afkomstige perifere bloedlymfocyten).

1.4.1.2. Media en kweekomstandigheden

Er moet worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden (kweekvat, CO₂ -concentratie, temperatuur en vochtigheid) voor de culturen. Permanente cellijnen en stammen moeten geregeld worden gecontroleerd om na te gaan of het modale aantal chromosomen stabiel is en er geen besmetting met mycoplasma heeft plaatsgevonden; indien dit laatste het geval is, mogen ze niet worden gebruikt. De normale tijd voor de celcyclus bij de gebruikte cellen en kweekomstandigheden moet bekend zijn.

1.4.1.3. *Bereiding van de culturen*

Permanente cellijnen en stammen : cellen uit stamculturen worden met een zodanige dichtheid in een kweekmedium geënt dat de kolonies voor het oogsten niet aaneengroeien, en bij 37°C geïncubeerd.

Lymphocyten : met een stollingsremmer (bv. heparine) behandeld volledig bloed of geïsoleerde lymfocyten van gezonde proefpersonen worden toegevoegd aan het kweekmedium met een mitogeen (bv. fytohemagglutinine) en bij 37°C geïncubeerd.

1.4.1.4. *Metabole activering*

De cellen dienen zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Het meest gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) of een mengsel van fenobarbiton en β -naftoflavon (10) (11) (12).

De post-mitochondriale fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 1-10 % (v/v) in het uiteindelijke medium. De omstandigheden voor het gebruik van een metabool activeringssysteem kunnen afhankelijk zijn van de aard van de geteste chemische verbinding. In sommige gevallen zal wellicht meer dan een concentratie van de post-mitochondriale fractie moeten worden gebruikt.

Een aantal ontwikkelingen, bijvoorbeeld de opbouw van genetisch aangepaste cellijnen waarin specifieke activeringsenzymen tot expressie komen, kan endogene activering mogelijk maken. Voor de keuze van de gebruikte cellijnen moet een wetenschappelijke verantwoording worden gegeven (bv. aan de hand van de relevantie van het cytochrom P450-isoenzym voor het metabolisme van de teststof).

1.4.1.5. *Teststof/Bereiding*

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de behandeling van de cellen worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks aan het testsysteem worden toegediend en/of vóór de behandeling worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. **Testomstandigheden**

1.4.2.1. *Oplosmiddel/Medium*

Chemische reacties tussen het oplosmiddel/medium en de teststof moeten uitgesloten zijn en het oplosmiddel/medium moet verenigbaar zijn met het overleven van de cellen en de S9-activiteit. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt. Wanneer stoffen worden getest die in water instabiel zijn, moeten de gebruikte organische oplosmiddelen watervrij zijn. Water kan door toevoeging van een moleculaire zeef worden verwijderd.

1.4.2.2. *Blootstellingsconcentraties*

Bij de bepaling van de hoogste concentratie moet onder andere rekening worden gehouden met de cytotoxiciteit, de oplosbaarheid in het testsysteem en veranderingen in de pH of de osmolaliteit.

De cytotoxiciteit moet met en zonder metabole activering in het hoofdexperiment worden bepaald aan de hand van adequate indicaties omtrent de integriteit en de groei van de cellen, zoals de mate van confluentie, het aantal levensvatbare cellen of de mitotische index. Het kan nuttig zijn vooraf een apart experiment uit te voeren om de cytotoxiciteit en de oplosbaarheid te bepalen.

Er moeten ten minste drie analyseerbare concentraties worden gebruikt. Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten deze concentraties een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken; dit betekent meestal dat de concentraties niet meer dan een factor 2 tot $\sqrt{10}$ uit elkaar mogen liggen. Bij het oogsten moet de hoogste concentratie een significante verlaging van de mate van confluentie, het aantal cellen of de mitotische index veroorzaken (voor alle parameters meer dan 50 %). De mitotische index is slechts een indirecte maat voor de cytotoxische/cytostatische effecten en is afhankelijk van het tijdstip na de behandeling. De mitotische index is echter aanvaardbaar voor culturen in suspensie, waarbij andere metingen van de toxiciteit omslachtig en onpraktisch kunnen zijn. Informatie over de kinetiek van de celcyclus, zoals de gemiddelde generatietijd (GGT), kan als aanvulling worden gebruikt. De GGT is echter een algeheel gemiddelde waaruit niet altijd blijkt of er achterblijvende deelpopulaties zijn en zelfs een geringe stijging van de GGT kan samengaan met een zeer aanzienlijke vertraging op het moment waarop de hoeveelheid afwijkingen maximaal is.

Bij stoffen met een betrekkelijk geringe cytotoxiciteit moet de maximale concentratie 5 μ l/ml, 5mg/ml of 0,01 M (de laagste van deze drie) zijn.

Bij betrekkelijk onoplosbare stoffen die bij lagere concentraties dan de oplosbaarheidsgrens niet toxisch zijn, moet de hoogste dosis een concentratie boven de oplosbaarheidsgrens in het uiteindelijke kweekmedium aan het eind van de behandelingsperiode zijn. In sommige gevallen (bv. wanneer de toxiciteit alleen optreedt bij hogere concentraties dan de oplosbaarheidsgrens, is het raadzaam bij meer dan een concentratie met zichtbaar neerslag te testen. Het kan nuttig zijn de oplosbaarheid aan het begin en het eind van de behandeling te bepalen, aangezien de oplosbaarheid tijdens de blootstelling in het testsysteem door de aanwezigheid van bijvoorbeeld cellen, S9 of serum kan veranderen. Onoplosbaarheid kan met het blote oog worden geconstateerd. Het neerslag mag niet storen bij het scoren.

1.4.2.3. Negatieve en positieve controles

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel of medium) controles worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabole activering. Wanneer metabole activering wordt gebruikt, moet de voor de positieve controle gebruikte chemische stof activering vereisen om een mutagene reactie te veroorzaken.

Voor de positieve controles moet een bekend klastogeen worden gebruikt, waarvan op het blootstellingsniveau een reproduceerbare en detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht om de gevoeligheid van het testsysteem aan te tonen.

De concentraties van de positieve controle moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglaasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt :

Metabole activering	Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Zonder exogene metabole activering	Methylmethaansulfonaat	66-27-3	200-625-0
	Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
	Ethylnitrosourem	759-73-9	212-072-2
	Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
	4-Nitrochinoline-N-oxide	56-57-5	200-281-1
Met exogene metabole activering	Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5
	Cyclofosfamide	50-18-0	200-015-4
	Cyclofosfamide monohydraat	6055-19-2	

Ook andere geschikte stoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt. Waar mogelijk dient het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle te worden overwogen.

Voor elk oogsttijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de culturen met teststof worden behandeld. Daarnaast moeten er ook controles worden gebruikt waaraan niets wordt toegediend, tenzij in het verleden reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

1.4.3. Uitvoering

1.4.3.1. Behandeling met de teststof

Delende cellen worden zowel met als zonder metabool activeringssysteem met de teststof behandeld. De behandeling van lymfocyten moet ongeveer 48 uur na de mitogene stimulering beginnen.

1.4.3.2. Normaal gesproken moeten voor elke concentratie twee culturen worden gebruikt en voor culturen met negatieve/oplosmiddelcontrole wordt dit sterk aanbevolen.

Wanneer aan de hand van gegevens uit het verleden kan worden aangetoond dat de verschillen tussen duploculturen minimaal zijn (13) (14), kan het gebruik van één cultuur voor elke concentratie aanvaardbaar zijn.

Bij het testen van gassen of vluchtige stoffen moet een daarvoor geschikte methode worden gevolgd, bijvoorbeeld in een gesloten kweekvat (15) (16).

1.4.3.3. Oogsttijdstippen

Bij het eerste experiment moeten de cellen zowel met als zonder metabole activering gedurende drie tot zes uur aan de teststof worden blootgesteld en wordt op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5-maal de normale lengte van een celcyclus na het begin van de behandeling bemonsterd (12). Als op deze wijze zowel met als zonder activering negatieve resultaten worden verkregen, wordt een nieuw experiment zonder activering uitgevoerd, waarbij de behandeling wordt voortgezet totdat op een tijdstip dat overeenkomt met ongeveer 1,5-maal de normale lengte van een celcyclus wordt bemonsterd. Voor sommige stoffen gaat de detectie beter bij een behandelings/bemonsteringstijd van meer dan 1,5-maal de lengte van de celcyclus. Negatieve resultaten met metabole activering moeten per geval worden bevestigd. Wanneer bevestiging van negatieve resultaten niet nodig wordt geacht, moet hiervoor een motivering worden gegeven.

1.4.3.4. Chromosoompreparaten

De celculturen worden meestal gedurende één tot drie uur vóór het oogsten behandeld met Colcemid® of colchicine. Elke celcultuur wordt afzonderlijk geogst en behandeld voor het maken van chromosoompreparaten.

Dit houdt in dat de cellen een hypotone behandeling krijgen, gevolgd door fixatie en kleuring.

1.4.3.5. Analyse

Alle objectglaasjes, ook die van de positieve en negatieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Aangezien bij de fixatie vaak een gedeelte van de metafasecellen breekt, waarbij chromosomen verloren gaan, moeten de gescoorde cellen voor alle celtypes het modale aantal ± 2 centromeren bevatten. Per concentratie en controle moeten minimaal 200 goed gespreide metafasen worden gescoord, indien van toepassing gelijkelijk verdeeld over de duplobepalingen. Wanneer een groot aantal afwijkingen wordt geconstateerd, kan dit aantal worden verlaagd.

Hoewel de test bedoeld is om structurele chromosoomafwijkingen op te sporen, is het belangrijk dat bij waarneming van polyploidie en endoreduplicatie ook deze verschijnselen worden geregistreerd.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Aangezien de cel bij dit experiment de eenheid is, moet het percentage cellen met één of meer structurele chromosoomafwijkingen worden bepaald. Er moet een overzicht worden gegeven van de verschillende soorten structurele chromosoomafwijkingen met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controleculturen voorkomen. Hiaten worden apart geregistreerd en gerapporteerd, maar worden meestal niet in de totale frequentie van de afwijkingen opgenomen.

Gelijktijdige metingen van de cytotoxiciteit voor alle behandelde en negatieve controleculturen bij de hoofdexperimenten dienen ook te worden geregistreerd.

De gegevens moeten voor elke cultuur apart worden verstrekt. Daarnaast moet er een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden samengesteld.

Een duidelijk positieve reactie behoeft niet te worden bevestigd. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden. De noodzakelijke bevestiging van negatieve resultaten is al onder punt 1.4.3.3. besproken. Bij vervolggexperimenten dient wijziging van parameters te worden overwogen om de bepaling uit te breiden tot een breder scala van omstandigheden.

Parameters die voor wijziging in aanmerking komen zijn bijvoorbeeld de concentratie-intervallen en de omstandigheden bij metabole activering.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een concentratieafhankelijke of een reproduceerbare stijging van het aantal cellen met chromosoomafwijkingen. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (3) (13). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Een stijging van het aantal polyploïde cellen kan erop wijzen dat de teststof in staat is mitotische processen te remmen en numerieke chromosoomafwijkingen te induceren. Een stijging van het aantal cellen met endoreduplicatie van chromosomen kan erop wijzen dat de teststof in staat is de voortgang van de celcyclus te remmen (17) (18).

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof in dit systeem als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vitrotest op chromosoomafwijkingen wijzen erop dat de teststof in gekweekte somatische zoogdiercellen structurele chromosoomafwijkingen induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in gekweekte somatische zoogdiercellen geen chromosoomafwijkingen induceert.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel/Medium :

- motivering voor de keuze van het medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Cellen :

- aard en herkomst van de cellen;
- kenmerken van het karyotype en bruikbaarheid van het gebruikte celtype;
- afwezigheid van mycoplasma, indien van toepassing;
- informatie over de lengte van de celcyclus;
- geslacht van de bloeddonors, volledig bloed of geïsoleerde lymfocyten, gebruikt mitogeen;
- aantal overentingen, indien van toepassing;
- methoden om de celcultuur in leven te houden, indien van toepassing;
- modaal aantal chromosomen.

Testomstandigheden :

- naam van de metafase-stopper, gebruikte concentratie en blootstellingsduur;
- achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal culturen, bijvoorbeeld gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid, indien beschikbaar;
- samenstelling van het medium en CO₂ -concentratie, indien van toepassing;
- concentratie van de teststof;
- toegevoegd volume medium en teststof;
- incubatietemperatuur;
- incubatietijd;
- duur van de behandeling;
- celdichtheid bij het enten, indien van toepassing;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem, met inbegrip van aanvaardbaarheidscriteria;
- positieve en negatieve controles;
- methoden voor de bereiding van de objectglaasjes;
- criteria voor het scoren van afwijkingen;
- aantal geanalyseerde metafases;
- methoden voor de meting van de toxiciteit;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten :

- tekenen van toxiciteit, bijvoorbeeld de mate van confluentie, gegevens over de celcyclus, het aantal cellen en de mitotische index;
- neerslagverschijnselen;
- gegevens over de pH en de osmolaliteit van het behandelingsmedium, indien bepaald;
- definitie voor afwijkingen, met inbegrip van hiaten;
- het aantal cellen met chromosoomafwijkingen en de aard van de chromosoomafwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elke behandelde en controlecultuur;
- veranderingen in de ploïdie, indien waargenomen;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- eventuele statistische analyses;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

- (1) Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In : Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (2) Ishidate, M.Jr. and Sofuni, T. (1985). The In Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In : Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427-432.
- (3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpoo, J., Margolin, G.H., Resnick, M.A., Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells : Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), pp. 1-175.
- (4) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.
- (5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, pp. 297-305.
- (6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (7) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (8) Natarajan, A.T., Bates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System In Vitro. I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, pp. 83-90.
- (9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro. *Mutation Res.*, 66, pp. 277-290.
- (10) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In : de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*. Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
- (12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on In Vitro Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312, pp. 241-261.
- (13) Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In : *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
- (14) Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994). Replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. *Mutation Res.*, 312, pp. 139-149.
- (15) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooley, 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.
- (16) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels of Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
- (17) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.
- (18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

Bijlage IB

« B.11. MUTAGENITEIT - IN-VIVOTEST OP CHROMOSOOMAFWIJINGEN IN BEENMERGCELLEN VAN ZOOGDIEREN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 475 van de OESO : Test op chromosoomafwijkingen in beenmergcellen van zoogdieren (1997).

1.1. INLEIDING

De in-vivotest op chromosoomafwijkingen bij zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke stoffen structurele chromosoomafwijkingen bij beenmergcellen van dieren, meestal knaagdieren, veroorzaken (1) (2) (3) (4).

Er zijn twee soorten structurele afwijkingen : het chromosoomtype en het chromatidetype. Een toename van polyploidie kan erop wijzen dat een chemische stof numerieke afwijkingen kan veroorzaken. De meeste chemische mutagenen veroorzaken afwijkingen van het chromatidetype, maar ook het chromosoomtype komt voor. Chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens en het lijkt er sterk op dat chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen die veranderingen in oncogenen en tumorsuppressorgenen veroorzaken, betrokken zijn bij de inductie van kanker bij de mens en bij proefdieren.

Voor deze test worden meestal knaagdieren gebruikt. Het doelweefsel is het beenmerg aangezien dit een sterk doorbloed weefsel is en een populatie snel delende cellen bevat die gemakkelijk kunnen worden geïsoleerd en verwerkt. De methode is niet geschikt voor andere diersoorten en doelweefsels.

Deze test op chromosoomafwijkingen is bijzonder geschikt om het gevaar van mutagene effecten te evalueren, aangezien rekening kan worden gehouden met factoren die samenhangen met het metabolisme in vivo, de farmacokinetiek en de DNA-herstelsynthese, hoewel deze aspecten van soort tot soort en van weefsel tot weefsel kunnen verschillen. Een in-vivotest is ook geschikt om een in vitro gesignaleerd mutageen effect nader te onderzoeken.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof of een reactieve metaboliet daarvan niet in het doelweefsel terechtkomt, is deze test niet geschikt.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Afwijking van het chromatidetype : structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in individuele chromatiden ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Afwijking van het chromosoomtype : structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in beide chromatiden op dezelfde plaats ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Endoreduplicatie : een proces waarbij de kern na een S-fase met DNA-replicatie niet tot mitose overgaat, maar opnieuw een S-fase begint. Het resultaat is chromosomen met 4, 8, 16, ... chromatiden.

Hiaat : een achromatische beschadiging die kleiner is dan de breedte van één chromatide en waarbij de fout in de uitlijning van de chromatiden minimaal is.

Numerieke afwijking : een verandering in het aantal chromosomen ten opzichte van het normale aantal dat kenmerkend is voor de gebruikte cellen.

Polyploidie : het voorkomen van een ander veelvoud van het haploïde aantal chromosomen (n) dan het diploïde aantal (d.w.z. 3n, 4n, enz.).

Structurele afwijking : een verandering in de chromosoomstructuur die bij microscopisch onderzoek tijdens de metafase van de celdeling kan worden waargenomen in de vorm van deleties, fragmenten en intra- of interchromosomale uitwisselingen.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De dieren worden langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld en op geschikte tijdstippen na de behandeling gedood. Voordat de dieren worden gedood, worden ze behandeld met een metafasesstopper (bv. colchicine of Colcemid®). Vervolgens worden chromosoompreparaten van de beenmergcellen gemaakt, die worden gekleurd; de cellen in de metafase worden geanalyseerd op chromosoomafwijkingen.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. Voorbereiding

1.4.1.1. Keuze van de diersoort

Meestal worden ratten, muizen of Chinese hamsters gebruikt, maar in principe komt elke geschikte zoogdiersoort in aanmerking. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal ±20 % van het gemiddelde gewicht van elk geslacht bedragen.

1.4.1.2. Huisvesting en voeding

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60 %.

1.4.1.3. Voorbereiding van de dieren

Gezonde jonge volwassen dieren worden aselekt ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt. De dieren krijgen een unieke identificatie. Ze krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren.

1.4.1.4. Bereiding van de doseringen

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. Testomstandigheden

1.4.2.1. Oplosmiddel/Medium

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

1.4.2.2. Controles

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles voor elk geslacht worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt die in vivo structurele afwijkingen veroorzaakt op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht. De doseringen van de positieve controles moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof en slechts op één tijdstip te bemonsteren. Waar mogelijk kan het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt :

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
Ethylnitrosourem	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclofosfamide Cyclofosfamide monohydraat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Triethyleenmelamine	51-18-3	200-083-5

Voor elk bemonsteringstijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld, tenzij uit in het verleden uitgevoerde controles aanvaardbare gegevens beschikbaar zijn over de spreiding over de dieren en de frequentie van cellen met chromosoomafwijkingen. Als voor de negatieve controles één bemonsteringstijdstip wordt gebruikt, kan hiervoor het beste het eerste bemonsteringstijdstip worden gekozen. Daarnaast moeten er ook onbehandelde controles worden gebruikt, tenzij in het verleden of in de literatuur reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel of medium geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

1.5. UITVOERING

1.5.1. Aantal en geslacht van de dieren

Elke behandelde en controlegroep moet minimaal vijf analyseerbare dieren per geslacht bevatten. Als er bij de uitvoering van de studie gegevens uit studies bij dezelfde soort en met dezelfde blootstellingsweg beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er geen significante verschillen in toxiciteit tussen de geslachten zijn, is het voldoende de test bij één geslacht uit te voeren. Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij dieren van het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd.

1.5.2. Behandelingsschema

De teststof wordt bij voorkeur in één dosis toegediend. De dosis kan eventueel worden gesplitst, waarbij de twee porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan enkele uren worden toegediend, om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken. Voor een ander doseringsschema moet een wetenschappelijke motivering worden gegeven.

De monsters worden op twee aparte tijdstippen na de behandeling op één dag genomen. Voor knaagdieren ligt het eerste bemonsteringstijdstip op 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus (deze cyclus duurt meestal 12 tot 18 uur) na de behandeling. Aangezien de voor de opname en het metabolisme van de teststof vereiste tijd en de effecten op de kinetiek van de celcyclus gevolgen kunnen hebben voor het optimale tijdstip om chromosoomafwijkingen te detecteren, verdient het aanbeveling 24 uur na het eerste bemonsteringstijdstip opnieuw te bemonsteren. Indien het doseringsschema meer dan één dag beslaat, moet één bemonsteringstijdstip op 1,5 maal de normale lengte van een celcyclus na de laatste toediening worden gebruikt.

Voordat de dieren worden gedood, worden ze intraperitoneaal geïnjecteerd met een adequate dosis metafasestopper (bv. Colcemid[®] of colchicine). De dieren worden na een adequate pauze bemonsterd. Voor muizen moet er ongeveer drie tot vijf uur worden gewacht en voor Chinese hamsters ongeveer vier tot vijf uur. De cellen worden uit het beenmerg gehaald en op chromosoomafwijkingen geanalyseerd.

1.5.3. Dosisniveaus

Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek (5). Als er sprake is van toxiciteit, worden er voor het eerste bemonsteringstijdstip drie dosisniveaus gebruikt. Deze dosisniveaus moeten een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken. Op het latere bemonsteringstijdstip behoeft alleen de hoogste dosis te worden gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden. Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit voor het beenmerg oplevert (bv. een daling van de mitotische index met meer dan 50 %).

1.5.4. Limiettest

Als een test met één dosis van minimaal 2000 mg/kg lichaamsgewicht, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek met drie dosisniveaus uit te voeren. Voor studies met een langere duur is de limietdosis 2000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij toediening gedurende maximaal 14 dagen en 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij toediening gedurende meer dan 14 dagen. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

1.5.5. Toediening van de doses

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule of door intraperitoneale injectie toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven.

Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal hevigere effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

1.5.6. Chromosoompreparaten

Onmiddellijk nadat het dier is gedood wordt beenmerg verwijderd, in een hypotone oplossing gebracht en gefixeerd. De cellen worden vervolgens op objectglaasjes uitgesmeerd en gekleurd.

1.5.7. Analyse

Als maat voor de cytotoxiciteit wordt in ten minste 1000 cellen per dier voor alle behandelde dieren (ook de positieve controles) en onbehandelde dieren voor de negatieve controle de mitotische index bepaald.

Voor elk dier worden minimaal 100 cellen geanalyseerd. Wanneer een groot aantal afwijkingen wordt geconstateerd, kan dit aantal worden verlaagd. Alle objectglaasjes, ook die van de positieve en negatieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Aangezien bij de bereiding van de objectglaasjes vaak een gedeelte van de metafasecellen breekt, waarbij chromosomen verloren gaan, moeten de gescoorde cellen $2n \pm 2$ centromeren bevatten.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens moeten voor elk dier apart in tabelvorm worden verstrekt. De eenheid bij dit experiment is het dier. Voor elk dier moet het aantal gescoorde cellen, het aantal afwijkingen per cel en het percentage cellen met een of meer structurele chromosoomafwijkingen worden bepaald. Er moet een overzicht worden gegeven van de verschillende soorten structurele chromosoomafwijkingen met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controlegroepen voorkomen. Hiaten worden apart geregistreerd en gerapporteerd maar meestal niet in de totale frequentie van de afwijkingen opgenomen. Als er geen aanwijzingen zijn voor verschillen in reactie tussen de geslachten, kunnen de gegevens van beide geslachten voor de statistische analyse worden gecombineerd.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een dosisafhankelijke stijging van het relatieve aantal cellen met chromosoomafwijkingen of een duidelijke stijging van het aantal cellen met afwijkingen in één dosisgroep bij één bemonsteringstijd. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (6). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden.

Een toename van polyploidie kan erop wijzen dat de teststof in staat is numerieke chromosoomafwijkingen te induceren. Een toename van endoreduplicatie kan erop wijzen dat de teststof in staat is de voortgang van de celcyclus te remmen (7) (8).

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt uitgevoerd, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vivotest op chromosoomafwijkingen wijzen erop dat een stof in het beenmerg van de geteste soort chromosoomafwijkingen induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in het beenmerg van de geteste soort geen chromosoomafwijkingen induceert.

De waarschijnlijkheid dat de teststof of de metabolieten daarvan in de grote bloedsomloop of specifiek het doelweefsel terechtkomen (systemische toxiciteit), dient te worden besproken.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel/Medium :

- motivering voor de keuze van het medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Proefdieren :

- gebruikte soort/stam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, huisvesting, voeding, enz.;
- het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

Testomstandigheden :

- positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles;
- gegevens uit het oriënterend onderzoek, indien dit is uitgevoerd;
- achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;
- gegevens over de bereiding van de teststof;
- gegevens over de toediening van de teststof;
- achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg;
- methoden om na te gaan of de teststof in de grote bloedsomloop of het doelweefsel is terechtgekomen, indien van toepassing;
- omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater;
- een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema;
- methoden voor de meting van de toxiciteit;
- naam van de metafasestopper, gebruikte concentratie en blootstellingsduur;
- methoden voor de bereiding van de objectglasjes;
- criteria voor het scoren van afwijkingen;
- aantal geanalyseerde cellen per dier;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten :

- tekenen van toxiciteit;
- mitotische index;
- aard en aantal van de afwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elk dier;
- totaal aantal afwijkingen per groep, met vermelding van het gemiddelde en de standaardafwijking;
- aantal cellen met afwijkingen per groep, met vermelding van het gemiddelde en de standaardafwijking;
- veranderingen in de ploïdie, indien waargenomen;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- eventuele statistische analyses;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve controles, met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde positieve controles.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

- (1) Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In : Mutagenicity Testing : a Practical Approach. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.
- (2) Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays : Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. Mutation Res., 189, pp. 157-165.
- (3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). In Vivo Cytogenetic Assays. In : D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Simada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the in Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. Mutation Res., 312, pp. 305-312.
- (5) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group : Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, pp. 313-319.
- (6) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays. In : UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part. III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 184-232.
- (7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res. 119, pp. 403-413.
- (8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, pp. 1362-1364 »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

Bijlage IC

« B.12. MUTAGENITEIT - IN-VIVOMICRONUCLEUSTEST BIJ ERYTROCYTEN VAN ZOOGDIEREN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 474 van de OESO : Micronucleustest bij erythrocyten van zoogdieren (1997).

1.1. INLEIDING

De in-vivomicronucleustest bij zoogdieren wordt gebruikt om na te gaan of de teststof schade toebrengt aan de chromosomen of het mitotisch apparaat van erythroblasten door de analyse van erythrocyten die worden verkregen uit het beenmerg en/of de perifere bloedcellen van dieren, meestal knaagdieren.

De micronucleustest is bedoeld om stoffen te signaleren die cytogenetische schade veroorzaken waarbij micronuclei ontstaan met achtergebleven chromosoomfragmenten of volledige chromosomen.

Wanneer een erythroblast uit het beenmerg zich ontwikkelt tot een polychromatische erythrocyt, wordt de hoofdkern uitgestoten; wanneer een micronucleus is ontstaan, kan deze in het overigens kernloze cytoplasma achterblijven. Omdat deze cellen geen hoofdkern bevatten, zijn de micronuclei gemakkelijker zichtbaar te maken. Een stijging van de frequentie waarmee bij behandelde dieren polychromatische erythrocyten met micronuclei worden aangetroffen, wijst op chromosoombeschadiging.

Voor deze test wordt meestal het beenmerg van knaagdieren gebruikt, aangezien in dit weefsel polychromatische erythrocyten worden gevormd. Het is ook aanvaardbaar het aantal onrijpe (polychromatische) erythrocyten met micronuclei in perifeer bloed te bepalen bij soorten waarvan is aangetoond dat de milt niet in staat is erythrocyten met micronuclei op te ruimen of dat de gevoeligheid om stoffen die structurele of numerieke chromosoomafwijkingen veroorzaken te detecteren afdoende is. Micronuclei kunnen aan de hand van een aantal criteria worden onderscheiden, bijvoorbeeld op grond van de aan- of afwezigheid van een kinetochoor- of centromeer-DNA in de micronuclei. Het belangrijkste eindpunt is de frequentie van onrijpe (polychromatische) erythrocyten met micronuclei. Het aantal rijpe (normochromatische) erythrocyten in het perifere bloed met micronuclei, bepaald bij een bekend aantal rijpe erythrocyten, kan ook als eindpunt van de bepaling worden gebruikt wanneer de dieren gedurende ten minste vier weken ononderbroken worden behandeld.

Deze in-vivomicronucleustest bij zoogdieren is bijzonder geschikt om het gevaar van mutagene effecten te evalueren, aangezien rekening kan worden gehouden met factoren die samenhangen met het metabolisme in vivo, de farmacokinetiek en de DNA-herstelsynthese, hoewel deze aspecten van soort tot soort, van weefsel tot weefsel en voor de verschillende genetische eindpunten kunnen verschillen. Een in-vivobepaling is ook geschikt om een in vitro gesignaleerd mutageen effect nader te onderzoeken.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof of een reactieve metaboliet daarvan niet in het doelweefsel terechtkomt, is deze test niet geschikt.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Centromeer (kinetochoor) : het deel of de delen van een chromosoom waar tijdens de celdeling de spoeldraden aan vastzitten, zodat de verplaatsing van de dochterchromosomen naar de polen van de dochtercellen regelmatig kan verlopen.

Micronucleus : een kleine kern die buiten en naast de hoofdkern van cellen tijdens de telofase van de mitose (meiose) ontstaat door achtergebleven chromosoomfragmenten of volledige chromosomen.

Normochromatische erythrocyt : een rijpe erythrocyt zonder ribosomen die van onrijpe polychromatische erythrocyten kan worden onderscheiden door de selectieve kleuring van ribosomen.

Polychromatische erythrocyt : een onrijpe erythrocyt in een tussentijdse ontwikkelingsfase die nog ribosomen bevat en derhalve van rijpe normochromatische erythrocyten kan worden onderscheiden door de selectieve kleuring van ribosomen.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De dieren worden langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld. Als beenmerg wordt gebruikt, worden de dieren op geschikte tijdstippen na de behandeling gedood, wordt het beenmerg verwijderd en worden er preparaten gemaakt die worden gekleurd (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Wanneer perifeer bloed wordt gebruikt, wordt op geschikte tijdstippen na de behandeling bloed afgenomen en worden er uitstrijkpreparaten gemaakt die worden gekleurd (4) (8) (9) (10). Bij studies met perifeer bloed moet er zo weinig mogelijk tijd verstrijken tussen de laatste blootstelling en het oogsten van de cellen. De preparaten worden onderzocht op de aanwezigheid van micronuclei.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. Voorbereiding

1.4.1.1. Keuze van de diersoort

Als beenmerg wordt gebruikt, worden muizen of ratten aanbevolen, maar in principe komt elke geschikte zoogdiersoort in aanmerking. Wanneer perifeer bloed wordt gebruikt, worden muizen aanbevolen. In principe komt elke geschikte zoogdiersoort echter in aanmerking, mits het een soort is waarvan de milt niet in staat is erythrocyten met micronuclei op te ruimen of een soort waarvan is aangetoond dat de gevoeligheid om stoffen die structurele of numerieke chromosoomafwijkingen veroorzaken te detecteren afdoende is. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal $\pm 20\%$ van het gemiddelde gewicht van elk geslacht bedragen.

1.4.1.2. Huisvesting en voeding

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60 %.

1.4.1.3. Voorbereiding van de dieren

Gezonde jonge volwassen dieren worden aselekt ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De dieren krijgen een unieke identificatie. Ze krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt.

1.4.1.4. Bereiding van de doseringen

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. Testomstandigheden

1.4.2.1. Oplosmiddel/Medium

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten referentiegegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

1.4.2.2. Controles

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles voor elk geslacht worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt die in vivo micronuclei veroorzaakt op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht. De doseringen van de positieve controles moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof en slechts op één tijdstip te bemonsteren. Waar mogelijk kan bovendien het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt :

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
N-Ethyl-N-nitrosourem	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclofosfamide Cyclofosfamide monohydraat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Triethyleenmelamine	51-18-3	200-083-5

Voor elk bemonsteringstijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld, tenzij uit in het verleden uitgevoerde controles aanvaardbare gegevens beschikbaar zijn over de spreiding over de dieren en de frequentie van cellen met micronuclei. Als voor de negatieve controles één bemonsteringstijdstip wordt gebruikt, kan hiervoor het beste het eerste bemonsteringstijdstip worden gekozen. Daarnaast moeten er ook onbehandelde controles worden gebruikt, tenzij in het verleden of in de literatuur reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel of medium geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

Als perifeer bloed wordt gebruikt, kan een monster dat vóór de behandeling wordt genomen ook aanvaardbaar zijn als gelijktijdige negatieve controle, maar alleen wanneer het gaat om een korte studie met perifeer bloed (bv. één tot drie behandelingen) en het resultaat binnen het verwachte interval door de in het verleden uitgevoerde controle ligt.

1.5. UITVOERING

1.5.1. Aantal en geslacht van de dieren

Elke behandelde en controlegroep moet minimaal vijf analyseerbare dieren per geslacht bevatten (11). Als er bij de uitvoering van de studie gegevens uit studies bij dezelfde soort en met dezelfde blootstellingsweg beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er geen significante verschillen in toxiciteit tussen de geslachten zijn, is het voldoende de test bij één geslacht uit te voeren. Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij dieren van het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd.

1.5.2. Behandelingsschema

Er kan geen standaardbehandelingsschema (d.w.z. één, twee of meer behandelingen met een interval van 24 uur) worden aanbevolen. De monsters van verlengde doseringsschema's zijn aanvaardbaar, mits een positief effect voor deze studie is aangetoond of, voor een negatieve studie, mits toxiciteit is aangetoond of de limietdosis is gebruikt, en de toediening tot het bemonsteringstijdstip is voortgezet. De dosis kan eventueel worden gesplitst, waarbij de twee porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan enkele uren worden toegediend, om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken.

De test kan op twee manieren worden uitgevoerd :

a) De dieren worden eenmaal met de teststof behandeld. Beenmergmonsters worden ten minste tweemaal genomen, de eerste keer niet eerder dan 24 uur na de behandeling en de laatste keer uiterlijk 48 uur na de behandeling, met een afdoende interval tussen de monsters. Voor het gebruik van een bemonsteringstijdstip binnen 24 uur na de behandeling moet een motivering worden gegeven. Monsters van perifeer bloed worden ten minste tweemaal genomen, de eerste keer niet eerder dan 36 uur na de behandeling, met een afdoende interval na het eerste monster, en de laatste keer uiterlijk 72 uur na de behandeling.

Wanneer op één bemonsteringstijdstip een positieve reactie wordt gesignaleerd, behoeven er geen verdere monsters meer te worden genomen.

b) Als twee of meer dagelijkse behandelingen worden gebruikt (bv. twee of meer behandelingen met een interval van 24 uur), moet de bemonstering voor het beenmerg eenmaal gebeuren tussen 18 en 24 uur na de laatste behandeling en voor het perifere bloed eenmaal tussen 36 en 48 uur na de laatste behandeling (12).

Indien dit nuttig is, kunnen daarnaast ook andere bemonsteringstijdstippen worden gebruikt.

1.5.3. Dosisniveaus

Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingschema als bij het hoofdonderzoek (13). Als er sprake is van toxiciteit, worden er voor het eerste bemonsteringstijdstip drie dosisniveaus gebruikt. Deze dosisniveaus moeten een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken. Op het latere bemonsteringstijdstip behoeft alleen de hoogste dosis te worden gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden. Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit voor het beenmerg oplevert (bv. een daling van de verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal erythrocyten in het beenmerg of het perifere bloed).

1.5.4. Limiettest

Als een test met één dosis van minimaal 2 000 mg/kg lichaamsgewicht, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek met drie dosisniveaus uit te voeren. Voor studies met een langere duur is de limietdosis 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij toediening gedurende maximaal 14 dagen en 1 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag bij toediening gedurende meer dan 14 dagen. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

1.5.5. Toediening van de doses

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule of door intraperitoneale injectie toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven.

Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal heviger effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

1.5.6. Beenmerg/bloedpreparaten

De beenmergcellen worden meestal volgens gangbare methoden uit het dijbeen of scheenbeen van pas gedode dieren verwijderd, geprepareerd en gekleurd. Perifeer bloed wordt uit de staartader of een ander geschikt bloedvat afgenomen. De bloedcellen worden onmiddellijk supravitaal gekleurd (8) (9) (10) of er wordt een uitstrijkpreparaat gemaakt dat vervolgens wordt gekleurd. Door het gebruik van een DNA-specifieke kleurstof (bv. acridine oranje (14) of Hoechst 33258 plus pyronine-Y (15)) kunnen sommige artefacten die zich bij het gebruik van niet voor DNA specifieke kleurstoffen kunnen voordoen, worden voorkomen. Dit neemt niet weg dat ook klassieke kleurstoffen (zoals Giemsa) kunnen worden gebruikt. Ook andere systemen (zoals cellulosekolommen om cellen die een kern bevatten te verwijderen (16)) kunnen worden gebruikt, mits is aangetoond dat deze methoden geschikt zijn voor micronucleuspreparaten in het laboratorium.

1.5.7. Analyse

Voor elk dier wordt de verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal (onrijpe + rijpe) erythrocyten bepaald door in totaal voor het beenmerg ten minste 200 erythrocyten en voor het perifere bloed ten minste 1 000 erythrocyten te tellen (17). Alle objectglazjes, ook die van de negatieve en positieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Voor de bepaling van de frequentie waarmee onrijpe erythrocyten met micronuclei voorkomen, worden ten minste 2 000 onrijpe erythrocyten per dier gescoord. Aanvullende informatie kan worden verkregen door rijpe erythrocyten op micronuclei te scoren.

Bij de analyse van de objectglazjes mag de verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal erythrocyten niet lager dan 20 % van de controlewaarde zijn. Wanneer de dieren onafgebroken gedurende ten minste vier weken zijn behandeld, kunnen ook ten minste 2 000 rijpe erythrocyten per dier op het voorkomen van micronuclei worden gescoord. Geautomatiseerde analysesystemen (beeldanalyse en celsuspensie-doorstroomecytometrie) zijn aanvaardbaar als alternatief voor handmatige beoordeling, indien ze afdoende zijn gemotiveerd en gevalideerd.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens moeten voor elke dier apart in tabelvorm worden verstrekt. De eenheid bij dit experiment is het dier. Voor elk onderzocht dier worden het aantal gescoorde onrijpe erythrocyten, het aantal onrijpe erythrocyten met micronuclei en het aantal onrijpe erythrocyten op het totale aantal apart vermeld. Wanneer de dieren onafgebroken gedurende ten minste vier weken zijn behandeld, moeten de gegevens over rijpe erythrocyten ook worden vermeld als deze zijn verzameld. Voor elk dier worden de verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal erythrocyten en, indien dit zinnig wordt geacht, het percentage van de erythrocyten met micronuclei vermeld. Als er geen aanwijzingen zijn voor verschillen in reactie tussen de geslachten, kunnen de gegevens van beide geslachten voor de statistische analyse worden gecombineerd.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een dosisafhankelijke stijging van het aantal cellen met micronuclei of een duidelijke stijging van het aantal cellen met micronuclei in één dosisgroep bij één bemonsteringstijdstip. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (18) (19). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de micronucleustest wijzen erop dat de stof micronuclei induceert die ontstaan door chromosoombeschadigingen of beschadiging van het mitotisch apparaat in de erythroblasten van de geteste soort. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden geen micronuclei in de onrijpe erythrocyten van de geteste soort veroorzaakt.

De waarschijnlijkheid dat de teststof of de metabolieten daarvan in de grote bloedsomloop of specifiek het doelweefsel terechtkomen (systemische toxiciteit), dient te worden besproken.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel/Medium :

- motivering voor de keuze van het medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Proefdieren :

- gebruikte soort/stam;
- aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;
- herkomst, huisvesting, voeding enz.;
- het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

Testomstandigheden :

- gegevens over positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles;
- gegevens uit het oriënterend onderzoek, indien dit is uitgevoerd;
- achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus;
- gegevens over de bereiding van de teststof;
- gegevens over de toediening van de teststof;
- achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg;
- methoden om na te gaan of de teststof in de grote bloedsomloop of het doelweefsel is terechtgekomen, indien van toepassing;
- omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing;
- gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater;
- een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema;
- methoden voor de bereiding van de objectglaasjes;
- methoden voor de meting van de toxiciteit;
- criteria voor het scoren van onrijpe erythrocyten met micronuclei;
- aantal geanalyseerde cellen per dier;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten :

- tekenen van toxiciteit;
- verhouding tussen het aantal onrijpe erythrocyten en het totale aantal erythrocyten;
- aantal onrijpe erythrocyten met micronuclei, afzonderlijk vermeld voor elk dier;
- gemiddelde \pm standaardafwijking van het aantal onrijpe erythrocyten met micronuclei per groep;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- statistische analyses en gevolgde methodes;
- gegevens over tegelijkertijd en in het verleden uitgevoerde negatieve controles;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde positieve controles.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

- (1) Heddle, J.A. (1973). A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187-190.
- (2) Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9-15.
- (3) Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutation Res.* 123, pp. 61-118.
- (4) Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A. (1990). The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29-80.
- (5) MacGregor, J.T., Schlegel, R., Choy, W.N., and Wehr, C.M. (1983). Micronuclei in Circulating Erythrocytes : A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. In : « Developments in Science and Practice of Toxicology », Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp. 555-558.
- (6) MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D. (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes. *Mutation Res.* 189, pp. 103-122.
- (7) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.E. (1990). The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test : Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513-522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coates Slides. *Mutation Res.*, 245, pp. 245-249.
- (9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining : The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. *Mutation Res.*, 278, pp. 83-98.
- (10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS : The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, pp. 153-159.
- (11) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). In Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res.*, 312, pp. 293-304.
- (12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, pp. 313-319.
- (13) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Rochold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group : Dose Setting in In vivo Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.*, 120, pp. 241-247.
- (15) MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y., *Mutation Res.*, 120, pp. 269-275.
- (16) Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 213, pp. 91-104.
- (17) Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 347, pp. 97-99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). In Vivo Cytogenetics Assay. In : D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (19) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays. In : D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

Bijlage ID

« B.13/14. MUTAGENITEIT - TERUGMUTATIETEST MET BACTERIËN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 471 van de OESO : Terugmutatietest met bacteriën (1997).

1.1. INLEIDING

Bij de terugmutatietest met bacteriën worden aminozuurafhankelijke stammen van *Salmonella typhimurium* en *Escherichia coli* gebruikt voor de detectie van puntmutaties, waarbij vervanging, toevoeging of deletie van een of enkele DNA-basenparen optreedt (1) (2) (3). Deze terugmutatietest met bacteriën is gebaseerd op het beginsel dat mutaties worden gedetecteerd die ertoe leiden dat in de teststammen aanwezige mutaties en daarmee de functionele capaciteit van de bacteriën om een essentieel aminozuur te synthetiseren worden hersteld.

Deze teruggemuteerde bacteriën worden zichtbaar doordat ze kunnen groeien zonder het aminozuur dat de ouderstam nodig heeft.

Puntmutaties veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens en het lijkt er sterk op dat puntmutaties in oncogenen en tumorsuppressorgenen van somatische cellen betrokken zijn bij het ontstaan van tumoren bij de mens en bij proefdieren. De terugmutatietest met bacteriën is snel, goedkoop en betrekkelijk gemakkelijk uit te voeren. Veel van de teststammen hebben verschillende kenmerken waardoor ze gevoeliger zijn voor de detectie van mutaties, zoals reactieve DNA-sequenties op de terugmutatieplaatsen, een verhoogde permeabiliteit van de cel voor grote moleculen en de afwezigheid van DNA-herstelsystemen of de stimulering van foutgevoelige DNA-herstelprocessen. De specificiteit van de teststammen kan enige nuttige informatie opleveren over de aard van de mutaties die door genotoxische stoffen worden geïnduceerd. Er zijn zeer veel gegevens beschikbaar over de resultaten van de terugmutatietest met bacteriën voor een grote verscheidenheid van structuren en er zijn betrouwbare methodologieën ontwikkeld voor het testen van chemische stoffen met uiteenlopende fysisch-chemische eigenschappen, waaronder ook vluchtige stoffen.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Terugmutatietest bij *Salmonella typhimurium* of *Escherichia coli* : een test voor de detectie van mutaties in een aminozuurafhankelijke stam (respectievelijk histidine of tryptofaan), waarbij een stam ontstaat die onafhankelijk is van een externe aminozuurbron.

Mutageen met basenpaarvervangning : een stof die een wijziging van een base in het DNA veroorzaakt. Bij een terugmutatietest kan dit op de plaats van de oorspronkelijke mutatie of op een andere plaats in het bacteriële genoom gebeuren.

Mutageen met leesraamverschuiving : een stof die invoeging of deletie van een of meer basenparen in het DNA veroorzaakt, waardoor het leesraam in het RNA wijzigt.

1.3. TOELICHTING

Voor de terugmutatietest met bacteriën worden prokaryote cellen gebruikt, die in bijvoorbeeld opname, metabolisme, chromosoomstructuur en DNA-herstelprocessen van zoogdiercellen verschillen. Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Dit metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in een zoogdiercel in vivo niet volledig nabootsen. De test levert dan ook geen directe informatie op over de potentiële mutagene en carcinogene werking van een stof bij zoogdieren.

De terugmutatietest met bacteriën wordt meestal gebruikt als een eerste screening voor een genotoxische werking en met name de inductie van puntmutaties. Op basis van een groot aantal gegevens is gebleken dat veel stoffen die bij deze test positief reageren, ook bij andere tests een mutagene werking vertonen. Er zijn voorbeelden van mutagene stoffen die met deze test niet worden gesignaleerd; dit kan wellicht worden toegeschreven aan de specifieke aard van het gedetecteerde eindpunt, verschillen in metabole activering of verschillen in biologische beschikbaarheid. Anderzijds kunnen factoren die de gevoeligheid van de terugmutatietest met bacteriën bevorderen, leiden tot een te hoge inschatting van de mutagene werking.

De terugmutatietest met bacteriën zal wellicht niet geschikt zijn voor de beoordeling van bepaalde klassen chemische stoffen zoals sterk bactericide verbindingen (bv. bepaalde antibiotica) en stoffen waarvan vermoed wordt (of bekend is) dat ze specifiek het replicatiesysteem van zoogdiercellen storen (bv. bepaalde topoisomeraseremmers en bepaalde nucleosideanalogen). In deze gevallen zullen mutatiestests met zoogdiercellen wellicht geschikter zijn.

Hoewel veel stoffen die positief op deze test reageren, ook carcinogeen voor zoogdieren zijn, is de correlatie niet absoluut. De correlatie is afhankelijk van de chemische klasse en er zijn carcinogenen die niet met deze test worden gesignaleerd omdat ze via andere niet-genotoxische mechanismen werken of via mechanismen die in bacteriecellen ontbreken.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Suspensies van bacteriecellen worden zowel met als zonder een exogeen metabool activeringssysteem aan de teststof blootgesteld. Bij de methode met geïntegreerde voedingsbodem worden deze suspensies met een topagar vermengd en direct op minimaal medium uitgeplaat. Bij de preincubatiemethode wordt het behandelde mengsel geïncubeerd en vervolgens met een topagar vermengd voordat het op minimaal medium wordt uitgeplaat. Bij beide technieken worden na twee of drie dagen incuberen de terugmutantkolonies geteld en wordt dit aantal vergeleken met het aantal spontane terugmutantkolonies op controleplaten met oplosmiddel.

Er zijn verschillende procedures voor de uitvoering van de terugmutatietest met bacteriën beschreven. Het meest gebruikt worden de methode met geïntegreerde voedingsbodem (1) (2) (3) (4), de preincubatiemethode (2) (3) (5) (6) (7) (8), de fluctuatiemethode (9) (10) en de suspensiemethode (11). Ook wijzigingen voor het testen van gassen of dampen zijn beschreven (12).

De hier beschreven procedures gelden vooral voor de methode met geïntegreerde voedingsbodem en de preïncubatiemethode. Beide zijn aanvaardbaar voor de uitvoering van experimenten zowel met als zonder metabole activering. Bij sommige stoffen verloopt de detectie efficiënter met de preïncubatiemethode. Deze stoffen behoren tot chemische klassen als alifatische nitrosamines met een korte keten, divalente metalen, aldehyden, azokleurstoffen en diazoverbindingen, pyrollizidine-alkaloiden, allylverbindingen en nitroverbindingen (3).

Tevens is het bekend dat bepaalde klassen mutagene verbindingen niet altijd met standaardprocedures als de methode met geïntegreerde voedingsbodem of de preïncubatiemethode worden gesignaleerd. Deze moeten als « speciale gevallen » worden beschouwd en voor de signalering daarvan wordt sterk aangeraden andere procedures te gebruiken. De volgende « speciale gevallen », kunnen worden genoemd (met voorbeelden van procedures die voor deze stoffen kunnen worden gebruikt) : azokleurstoffen en diazoverbindingen (3) (5) (6) (13), gassen en vluchtige stoffen (12) (14) (15) (16) en glycosiden (17) (18). Voor een afwijking van de standaardprocedure moet een wetenschappelijke motivering worden gegeven.

1.5. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.5.1. Voorbereiding

1.5.1.1. Bacteriën

Verse bacterieculturen worden gekweekt tot het laat-exponentiële of vroeg-stationaire groeistadium (ongeveer 10^9 cellen per ml). Culturen in de laat-stationaire fase mogen niet worden gebruikt. Het is van essentieel belang dat de bij het experiment gebruikte culturen een hoog gehalte aan levensvatbare bacteriën bevatten.

De titer kan aan de hand van gegevens over groeicurves uit in het verleden uitgevoerde controles worden bepaald of door met behulp van een uitplaatexperiment het aantal levensvatbare cellen te bepalen.

De aanbevolen incubatietemperatuur is 37°C.

Er moeten ten minste vijf bacteriestammen worden gebruikt. Daarbij moeten vier stammen van *S. typhimurium* zijn (TA 1535; TA 1537, TA 97a of TA 97; TA 98; en TA 100) waarvan is aangetoond dat de resultaten betrouwbaar en in verschillende laboratoria reproduceerbaar zijn. Deze vier stammen van *S. typhimurium* hebben GC-basenparen op de primaire terugmutatieplaats en het is bekend dat bepaalde oxiderende mutagenen, cross-linkende stoffen en hydrazines daarmee niet altijd worden gesignaleerd. Voor deze stoffen kunnen de stammen WP2 van *E. coli* of TA 102 van *S. typhimurium* worden gebruikt (19), die een AT-basenpaar op de primaire terugmutatieplaats hebben. Als combinatie van stammen wordt derhalve aanbevolen :

- TA 1535 van *S. typhimurium* en
- TA 1537 of TA 97 of TA 97a van *S. typhimurium* en
- TA 98 van *S. typhimurium* en
- TA 100 van *S. typhimurium* en
- WP2 uvrA van *E. coli* of WP2 uvrA (pKM101) van *E. coli* of TA 102 van *S. typhimurium*.

Om cross-linkende mutagenen te signaleren kan het de voorkeur verdienen TA 102 of een stam van *E. coli* die bedreven is in DNA-herstel (bv. WP2 (pKM101) van *E. coli*) te gebruiken.

Er moeten erkende procedures voor de bereiding van voorraadculturen, markercontrole en opslag worden gebruikt. Voor elk preparaat van de ingevroren voorraadcultuur moet de aminozuurafhankelijkheid voor de groei worden aangetoond (histidine voor stammen van *S. typhimurium* en tryptofaan voor stammen van *E. coli*). Ook ander fenotypekenmerken moeten worden gecontroleerd, namelijk : de aan- of afwezigheid van plasmiden met de R-factor, indien van toepassing (bv. resistentie tegen ampicilline bij de stammen TA 98, TA 100 en TA 97a of TA 97, WP2 uvrA en WP2 uvrA (pKM101) en resistentie tegen ampicilline en tetracycline bij stam TA 102); de aanwezigheid van karakteristieke mutaties (bv. de rfa-mutatie bij *S. typhimurium* door de gevoeligheid voor kristalviolet en de uvrA-mutatie bij *E. coli* of de uvrB-mutatie bij *S. typhimurium* door de gevoeligheid voor ultraviolet licht) (2) (3). Bij de stammen moeten ook spontane terugmutantkolonies voorkomen met een frequentie die ligt binnen het interval dat op grond van controlegegevens van het laboratorium uit het verleden kan worden verwacht en bij voorkeur binnen het interval dat in de literatuur wordt opgegeven.

1.5.1.2. Medium

Er wordt gebruikgemaakt van een geschikte minimale agar (bv. met minimaal medium E van Vogel-Bonner en glucose) en een topagar met histidine en biotine of tryptofaan om een aantal celdelingen mogelijk te maken (1) (2) (9).

1.5.1.3. Metabole activering

De bacteriën dienen zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Het meest gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (1) (2) of een combinatie van fenobarbiton en β -naftoflavon (18) (20) (21). De post-mitochondriale fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 5 tot 30 % (v/v) in het S9-mengsel. De keuze en de omstandigheden voor het gebruik van een metabool activeringssysteem kunnen afhankelijk zijn van de aard van de geteste chemische verbinding. In sommige gevallen kan het nuttig zijn meer dan een concentratie van de post-mitochondriale fractie te gebruiken. Voor azokleurstoffen en diazoverbindingen kan wellicht beter een reductief metabool activeringssysteem worden gebruikt (6) (13).

1.5.1.4. Teststof/Bereiding

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de behandeling van de bacteriën worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks aan het testsysteem worden toegediend en/of vóór behandeling worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen worden gebruikt. Chemische reacties tussen het oplosmiddel/medium en de teststof moeten uitgesloten zijn en het oplosmiddel/medium moet verenigbaar zijn met het overleven van de bacteriën en de S9-activiteit (22). Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt. Wanneer stoffen worden getest die in water instabiel zijn, moeten de gebruikte organische oplosmiddelen watervrij zijn.

1.5.2. Testomstandigheden

1.5.2.1. Teststammen (zie punt 1.5.1.1)

1.5.2.2. Blootstellingsconcentraties

Bij de bepaling van de grootste te gebruiken hoeveelheid teststof moet onder andere rekening worden gehouden met de cytotoxiciteit en de oplosbaarheid in het uiteindelijke behandelingsmengsel.

Het kan nuttig zijn vooraf een apart experiment uit te voeren om de toxiciteit en de oplosbaarheid te bepalen.

De cytotoxiciteit kan worden bepaald aan de hand van een daling in het aantal terugmutantkolonies, een opheldering of afname van de achtergrond of de mate waarin de behandelde culturen overleven. De cytotoxiciteit van een stof kan in aanwezigheid van een metabool activeringssysteem veranderen. De oplosbaarheid moet worden beoordeeld aan de hand van het met het blote oog zichtbare neerslaggedrag in het uiteindelijke mengsel onder de feitelijke testomstandigheden.

De aanbevolen maximale concentratie voor oplosbare niet-cytotoxische stoffen is 5 mg/plaat of 5 µ l/plaat.

Voor niet-cytotoxische stoffen die bij 5 mg/plaat of 5 µ l/plaat niet oplosbaar zijn, moet een of meer van de geteste concentraties in het uiteindelijke behandelingsmengsel onoplosbaar zijn. Teststoffen die al bij lagere concentraties dan 5 mg/plaat of 5 µ l/plaat cytotoxisch zijn, moeten tot een cytotoxische concentratie worden getest. Het neerslag mag niet storen bij het scoren.

Er moeten ten minste vijf analyseerbare concentraties van de teststof worden gebruikt met ongeveer een half log-interval (d.w.z. een factor $\sqrt{10}$) tussen de concentraties voor een eerste experiment. Kleinere intervallen kunnen nuttig zijn wanneer het verband tussen concentratie en respons wordt onderzocht. Hogere concentraties dan 5 mg/plaat of 5 µ l/plaat kunnen worden overwogen bij de beoordeling van stoffen die significante hoeveelheden potentieel mutagene verontreinigingen bevatten.

1.5.2.3. Negatieve en positieve controles

Bij elke bepaling moeten tegelijkertijd stam-specifieke positieve en negatieve (oplosmiddel of medium) controles worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabole activering. De concentraties van de positieve controle moeten zodanig worden gekozen dat voor elke bepaling wordt aangetoond dat deze correcte resultaten oplevert.

Voor bepalingen waarbij een metabool activeringssysteem wordt gebruikt, moet(en) de voor de positieve controle gebruikte referentiestof(fen) op basis van de aard van de gebruikte bacteriestam worden gekozen.

Voor bepalingen met metabole activering kunnen als positieve controle bijvoorbeeld worden gebruikt :

Stof	Cas-nr.	Einecs-nr.
9,10-dimethylantraceen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimethylbenz[a]antraceen	57-97-6	200-359-5
Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5
2-aminoantraceen	613-13-8	210-330-9
Cyclofosfamide Cyclofosfamide monohydraat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Voor de methode met reductieve metabole activering kan als positieve controle worden gebruikt :

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Kongo rood	573-58-0	209-358-4

2-aminoantraceen mag niet als enige indicator voor de werkzaamheid van het S9-mengsel worden gebruikt.

Als 2-aminoantraceen wordt gebruikt, moet elke charge S9 ook worden gekarakteriseerd met een mutageen waarvoor metabole activering met microsomale enzymen nodig is, zoals benzo[a]pyreen of dimethylbenzantraceen.

Voor bepalingen zonder exogeen metabool activeringssysteem kunnen als stam-specifieke positieve controle bijvoorbeeld worden gebruikt :

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.	Stam
Natriumazide	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 en TA 100
2-nitrofluoreen	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoacridine	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 en TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 en TA 97a
Cumeenhydroperoxide	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA en TA 102
N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA en WP2 uvrA(pKM101)
4-nitroquinoline-1-oxide	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA en WP2 uvrA(pKM101)
Furylfuramide (AF2)	3688-53-7		Stammen die plasmiden bevatten

Ook andere geschikte stoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt. Waar mogelijk dient het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle te worden overwogen.

In het experiment dienen negatieve controles te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium zonder teststof wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld. Daarnaast moeten er ook controles worden gebruikt waaraan niets wordt toegediend, tenzij in het verleden reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

1.5.3. Uitvoering

Voor de methode met geïntegreerde voedingsbodem (1) (2) (3) (4) zonder metabole activering wordt meestal 0,05 ml of 0,1 ml testoplossing, 0,1 ml verse bacteriecultuur (met ongeveer 10^8 levensvatbare cellen) en 0,5 ml steriele buffer gemengd met 2,0 ml topagar. Voor de bepaling met metabole activering wordt meestal 0,5 ml van het metabool activeringsmengsel met een afdoende hoeveelheid post-mitochondriale fractie (tussen 5 en 30 % (v/v) in het metabole activeringsmengsel) gemengd met de topagar (2,0 ml), de bacteriën en de test stof/testoplossing. De inhoud van elke buis wordt gemengd en uitgegoten over het oppervlak van een minimale agarplaat. De topagar krijgt voor de incubatie de gelegenheid te stollen.

Voor de preïncubatiemethode (2) (3) (5) (6) wordt de teststof/testoplossing gepreïncubeerd met de teststam (met ongeveer 10^8 levensvatbare cellen) en steriele buffer of het metabole activeringssysteem (0,5 ml), meestal gedurende minimaal 20 minuten bij 30-37°C, en vervolgens gemengd met de topagar en uitgegoten over het oppervlak van een minimale agarplaat. Meestal wordt 0,05 ml of 0,1 ml teststof/testoplossing, 0,1 ml bacteriën en 0,5 ml S9-mengsel of steriele buffer gemengd met 2,0 ml topagar. De buizen dienen gedurende de preïncubatie met behulp van een schudmachine te worden belucht.

Om een adequate raming van de spreiding te kunnen maken moeten voor elk dosisniveau drie platen worden gebruikt. Het gebruik van twee platen is aanvaardbaar wanneer daarvoor een wetenschappelijke motivering wordt gegeven. Wanneer nu en dan een plaat verloren gaat, maakt dit de bepaling niet noodzakelijkerwijs onbruikbaar.

Bij het testen van gasen of vluchtige stoffen moet een daarvoor geschikte methode worden gevolgd, bijvoorbeeld in een gesloten kweekvat (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Incubatie

Alle platen voor een bepaling worden gedurende 48-72 uur bij 37°C geïncubeerd. Na de incubatieperiode wordt het aantal terugmutantkolonies per plaat geteld.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens worden vermeld als het aantal terugmutantkolonies per plaat. Daarnaast moet ook het aantal terugmutantkolonies op de platen voor zowel negatieve (oplosmiddel en zonder behandeling, indien gebruikt) als positieve controle worden vermeld. Voor zowel de teststof als de positieve en negatieve (zonder behandeling en/of oplosmiddel) controle moeten de tellingen per plaat, het gemiddelde aantal terugmutantkolonies per plaat en de standaardafwijking worden vermeld.

Een duidelijk positieve reactie behoeft niet te worden bevestigd. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden. Negatieve resultaten moeten per geval worden bevestigd. Wanneer een bevestiging van negatieve resultaten niet nodig wordt geacht, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Bij vervollexperimenten dient wijziging van parameters te worden overwogen om de bepaling uit te breiden tot een breder scala van omstandigheden. Parameters die voor wijziging in aanmerking komen zijn bijvoorbeeld de concentratie-intervallen, de wijze van behandeling (geïntegreerde voedingsbodem of preïncubatie in vloeistof) en de omstandigheden bij metabole activering.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een concentratieafhankelijke stijging op het geteste interval en/of een reproduceerbare stijging bij een of meer concentraties van het aantal terugmutantkolonies per plaat bij ten minste één stam met of zonder metabool activeringssysteem (23). In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (24). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de terugmutatietest met bacteriën wijzen erop dat de teststof puntmutaties door basenpaarvervangings of leesraamverschuiving in het genoom van *Salmonella typhimurium* en/of *Escherichia coli* induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden bij de geteste soort niet mutageen is.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel/Medium :

- motivering voor de keuze van het oplosmiddel/medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Stammen :

- gebruikte stammen;
- aantal cellen per cultuur;
- kenmerken van de stam.

Testomstandigheden :

- hoeveelheid teststof per plaat (in mg/plaat of μ l/plaat) met vermelding van de achtergrond voor de keuze van de dosis en het aantal platen per concentratie;
- gebruikte media;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem, met inbegrip van aanvaardbaarheidscriteria;
- procedures voor de behandeling.

Resultaten :

- tekenen van toxiciteit;
- neerslagverschijnselen;
- tellingen per plaat;
- gemiddeld aantal terugmutantkolonies per plaat met de standaardafwijking;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- eventuele statistische analyses;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

- (1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.
- (2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.
- (4) Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay : A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, pp. 91-96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In : *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. pp. 273-285.
- (7) Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In : *Basic Mutagenicity Tests : UKEMS Part 1 Revised*. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
- (8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.
- (9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutation Res.*, 38, pp. 33-42.
- (10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and Bridges, J.W. (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In : *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.
- (11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella typhimurium. *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.
- (13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughan, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.
- (14) Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
- (16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in Salmonella typhimurium. *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.
- (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N. (1980). Fecalase : A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961-4965.
- (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of Salmonella typhimurium TA 102 with Escherichia coli WP2 Tester strains. *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In : « *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing* » Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
- (21) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.
- (23) Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987). Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. *Mutation Res.* 189, pp. 83-91.
- (24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In : *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

Bijlage IE

« B.17. MUTAGENITEIT - IN-VITROGENMUTATIE TEST MET ZOOGDIERCELLEN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 476 van de OESO : In-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen (1997).

1.1. INLEIDING

De in-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen kan worden gebruikt voor de detectie van genmutaties die door chemische stoffen zijn geïnduceerd. Geschikte cellijnen zijn bijvoorbeeld de L5178Y-muizenlymfocoomcellen, de cellijnen CHO, CHO-AS52 en V79 van Chinese hamsters en de humane TK6-lymfoblastoidcellen (1). Bij deze cellijnen zijn de meest gangbare genetische eindpunten : een mutatie bij thymidinekinase (TK), hypoxanthine-guanine-fosforibosyltransferase (HPRT) en transgeen xanthine-guanine-fosforibosyltransferase (XPRT). Bij de mutatie tests met TK, HPRT en XPRT worden verschillende spectra van genetische gebeurtenissen gedetecteerd. Door de ligging van TK en XPRT op autosomen kunnen genetische gebeurtenissen worden gedetecteerd (bv. grote deleties) die niet op de HPRT-locus op X-chromosomen worden gesignaleerd (2) (3) (4) (5) (6). Bij de in-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen kunnen culturen van permanente cellijnen of celstammen worden gebruikt. De gebruikte cellen worden geselecteerd op basis van het groeivermogen in een cultuur en de stabiliteit van de spontane mutatiefrequentie.

Bij in vitro uitgevoerde tests moet er meestal een exogene metabole activeringsbron worden gebruikt. Dit metabole activeringssysteem kan de omstandigheden in een zoogdiercel in vivo niet volledig nabootsen. Er moet goed op worden gelet dat omstandigheden die kunnen leiden tot positieve resultaten die niet het gevolg zijn van intrinsieke mutageniteit, worden vermeden. Positieve resultaten die niet het gevolg zijn van intrinsieke mutageniteit, kunnen ontstaan door veranderingen in de pH of de osmolaliteit of een sterke cytotoxiciteit (7).

Deze test wordt gebruikt voor de screening op mogelijke mutagenen en carcinogenen voor zoogdieren. Veel stoffen die positief op deze test reageren, zijn carcinogeen voor zoogdieren, maar er is geen absolute correlatie tussen deze test en carcinogeniteit. De correlatie is afhankelijk van de chemische klasse en het lijkt er steeds meer op dat er carcinogenen zijn die niet met deze test worden gesignaleerd omdat ze blijkbaar via andere niet-genotoxische of in bacteriecellen afwezige mechanismen werken (6).

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Voorwaartse mutatie : een genmutatie van het oudertype naar de mutantvorm die leidt tot wijziging of verlies van de enzymactiviteit of de functie van het gecodeerde eiwit.

Mutageen met basenpaarvervanging : een stof die vervanging van een of meer basenparen in het DNA veroorzaakt.

Mutageen met leesraamverschuiving : een stof die invoeging of deletie van een of meer basenparen in het DNA-molecuul veroorzaakt.

Fenotypische expressietijd : de periode gedurende welke ongewijzigde genproducten uit pas gemuteerde cellen verdwijnen.

Mutantfrequentie : de verhouding tussen het aantal waargenomen mutantcellen en het aantal levensvatbare cellen.

Relatieve totale groei : de toename van het aantal cellen in de loop van de tijd in vergelijking met een controle-cel populatie, berekend als het product van de suspensiegroei in vergelijking met de negatieve controle en de kloneringsefficiëntie in vergelijking met de negatieve controle.

Relatieve suspensiegroei : de toename van het aantal cellen tijdens de expressieperiode in vergelijking met de negatieve controle.

Levensvatbaarheid : de kloneringsefficiëntie van de behandelde cellen bij het uitplaten in selectieve omstandigheden na de expressieperiode.

Overleving : de kloneringsefficiëntie van de behandelde cellen bij het uitplaten aan het eind van de behandelingsperiode; de overleving wordt meestal uitgedrukt in vergelijking met de controle-cel populatie.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Cellen met een deficiëntie aan thymidinekinase (TK) door de mutatie TK^{+/-} — TK^{-/-} zijn resistent voor de cytotoxische effecten van de pyrimidine-analoog trifluor-thymidine (TFT). Cellen zonder deficiëntie aan thymidinekinase zijn gevoelig voor TFT, waardoor het celmetabolisme wordt geremd en er geen celdeling meer plaatsvindt. Dit betekent dat mutantcellen zich in aanwezigheid van TFT kunnen voortplanten en normale cellen, die thymidinekinase bevatten, niet. Analooq hieraan worden ook cellen met een deficiëntie aan HPRT of XPRT geselecteerd door resistentie voor 6-thioguanine (TG) of 8-azaguanine (AG). De eigenschappen van de teststof moeten zorgvuldig worden bekeken als een base-analoog of een met de selecterende stof verwante verbinding aan een van de genmutatie tests met zoogdiercellen wordt onderworpen. Eventuele vermoedens omtrent selectieve toxiciteit van de teststof bij mutantcellen en gewone cellen moeten nader worden onderzocht. Bij het testen van chemische stoffen die verwant zijn met de selecterende stof moet worden bevestigd of het selectiesysteem en de selecterende stof bruikbaar zijn (8). Cellen in een suspensie of een monolaagcultuur worden zowel met als zonder metabole activering gedurende een geschikte periode aan de teststof blootgesteld en overgeënt om de cytotoxiciteit te bepalen en fenotypische expressie mogelijk te maken alvorens de mutantcellen te selecteren (9) (10) (11) (12) (13). De cytotoxiciteit wordt meestal bepaald door de relatieve kloneringsefficiëntie (overleving) of de relatieve totale groei van de culturen na de behandelingsperiode te meten. De behandelde culturen blijven een voldoende lange periode, kenmerkend voor elke locus en elk celtype, in groeimedium om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutaties mogelijk te maken. De mutantfrequentie wordt bepaald door bekende aantallen cellen te enten in medium met de selecterende stof voor de detectie van mutantcellen en in medium zonder de selecterende stof voor de bepaling van de kloneringsefficiëntie (levensvatbaarheid). Na een geschikte incubatietijd worden de kolonies geteld. De mutantfrequentie wordt bepaald aan de hand van het aantal mutantkolonies in het selectieve medium en het aantal kolonies in het niet-selectieve medium.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. Voorbereiding

1.4.1.1. Cellen

Er kunnen verschillende soorten cellen voor deze test worden gebruikt, zoals subklonen van de cellijnen L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 of TK6. Van de bij deze test gebruikte cellen moet worden aangetoond dat ze gevoelig zijn voor chemische mutagenen en een hoge kloneringsefficiëntie en een stabiele spontane mutantfrequentie hebben. De cellen moeten op besmetting met mycoplasma worden gecontroleerd en mogen bij besmetting niet worden gebruikt.

De test moet zodanig worden opgezet dat deze een vooraf bepaalde gevoeligheid en onderscheidingsvermogen heeft. Het aantal cellen, culturen en concentraties van de teststof moet aan de hand van deze vooraf bepaalde parameters worden gekozen (14). Het minimale aantal levensvatbare cellen dat de behandeling overleeft en bij elke fase van de test wordt gebruikt, moet op basis van de spontane mutatiefrequentie worden gekozen. Een vuistregel is dat het gebruikte aantal cellen ten minste tien keer zo groot moet zijn als de inverse van de spontane mutatiefrequentie. Aanbevolen wordt echter ten minste 10^6 cellen te gebruiken. Er moeten afdoende gegevens uit het verleden over het gebruikte celsysteem beschikbaar zijn om aan te kunnen nemen dat de test consistente resultaten oplevert.

1.4.1.2. Media en kweekomstandigheden

Er moet worden gezorgd voor geschikte kweekmedia en incubatieomstandigheden (kweekvat), temperatuur, CO₂-concentratie, en vochtigheid). De media moeten worden gekozen op basis van de bij de test gebruikte selectieve systemen en celtypes. Het is vooral belangrijk dat de kweekomstandigheden zodanig worden gekozen dat de celgroei tijdens de expressieperiode en het kolonievormend vermogen van zowel de mutantcellen als de gewone cellen optimaal zijn.

1.4.1.3. Bereiding van de culturen

Cellen uit stamculturen worden in een kweekmedium geënt en bij 37 °C geïncubeerd. Het is wellicht nodig reeds aanwezige mutantcellen uit de cultuur te verwijderen voordat deze voor de test wordt gebruikt.

1.4.1.4. Metabole activering

De cellen dienen zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem aan de teststof te worden blootgesteld. Het meest gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie aangevuld met een cofactor (S9), verkregen uit de lever van knaagdieren die zijn behandeld met enzym-inducerende stoffen als Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) of een combinatie van fenobarbiton en β -naftoflavon (19) (20).

De post-mitochondriale fractie wordt meestal gebruikt bij een concentratie van 1-10 % (v/v) in het uiteindelijke medium. De keuze en omstandigheden voor het gebruik van een metabool activeringssysteem kunnen afhankelijk zijn van de aard van de geteste chemische verbinding. In sommige gevallen zal wellicht meer dan een concentratie van de post-mitochondriale fractie moeten worden gebruikt.

Een aantal ontwikkelingen, bijvoorbeeld de opbouw van genetisch aangepaste cellijnen waarin specifieke activeringsenzymen tot expressie komen, kan endogene activering mogelijk maken. Voor de keuze van de gebruikte cellijnen moet een wetenschappelijke verantwoording worden gegeven (bv. aan de hand van de relevantie van het cytochrom P450-isoenzym voor het metabolisme van de teststof).

1.4.1.5. Teststof/Bereiding

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de behandeling van de cellen worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks aan het testsysteem worden toegediend en/of vóór de behandeling worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. Testomstandigheden

1.4.2.1. Oplosmiddel/Medium

Chemische reacties tussen het oplosmiddel/medium en de teststof moeten uitgesloten zijn en het oplosmiddel/medium moet verenigbaar zijn met het overleven van de cellen en de S9-activiteit. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt. Wanneer stoffen worden getest die in water instabiel zijn, moeten de gebruikte organische oplosmiddelen watervrij zijn. Water kan door toevoeging van een moleculaire zeef worden verwijderd.

1.4.2.2. Blootstellingsconcentraties

Bij de bepaling van de hoogste concentratie moet onder andere rekening worden gehouden met de cytotoxiciteit, de oplosbaarheid in het testsysteem en veranderingen in de pH of de osmolaliteit.

De cytotoxiciteit moet met en zonder metabole activering in het hoofdexperiment worden bepaald aan de hand van adequate indicaties omtrent de integriteit en de groei van de cellen, zoals de relatieve kloneringsefficiëntie (overleving) of de relatieve totale groei. Het kan nuttig zijn vooraf een apart experiment uit te voeren om de cytotoxiciteit en de oplosbaarheid te bepalen.

Er moeten ten minste vier analyseerbare concentraties worden gebruikt. Wanneer er cytotoxiciteit optreedt, moeten deze concentraties een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken; dit betekent meestal dat de concentratieniveaus niet meer dan een factor 2 tot $\sqrt{10}$ uit elkaar mogen liggen. Als de maximale concentratie op cytotoxische effecten is gebaseerd, moet de relatieve overleving (relatieve kloneringsefficiëntie) of de relatieve totale groei daarbij op ongeveer 10-20 % liggen (maar niet lager dan 10 %). Bij stoffen met een betrekkelijk geringe cytotoxiciteit moet de maximale concentratie 5 mg/ml, 5 μ l/ml of 0,01 M (de laagste van deze drie) zijn.

Bij betrekkelijk onoplosbare stoffen moet de hoogste dosis bij of boven de oplosbaarheidsgrens onder de kweekomstandigheden liggen. De oplosbaarheidsgegevens moeten worden bepaald in het uiteindelijke behandelingsmedium waaraan de cellen worden blootgesteld. Het kan nuttig zijn de oplosbaarheid aan het begin en het eind van de behandeling te bepalen, aangezien de oplosbaarheid tijdens de blootstelling in het testsysteem door de aanwezigheid van bijvoorbeeld cellen, S9 of serum kan veranderen. Onoplosbaarheid kan met het blote oog worden geconstateerd. Het neerslag mag niet storen bij het scoren.

1.4.2.3. *Controles*

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel of medium) controles worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabole activering. Wanneer metabole activering wordt gebruikt, moet de voor de positieve controle gebruikte chemische stof activering vereisen om een mutagene reactie te veroorzaken.

Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt :

Metabole activering	Locus	Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Zonder exogene metabole activering	HPRT	Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosourem	759-73-9	212-072-2
	TK (kleine en grote kolonies)	Methylmethaansulfonaat	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Ethylmethaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
Ethylnitrosourem		759-73-9	212-072-2	
Met exogene metabole activering	HPRT	3-Methylcholanthreen	56-49-5	200-276-4
		N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimethylbenzanthraceen	57-97-6	200-359-5
	TK (kleine en grote kolonies)	Cyclofosfamide	50-18-0	200-015-4
		Cyclofosfamide monohydraat	6055-19-2	
		Benzo[a]pyreen	50-32-8	200-028-5
		3-Methylcholanthreen	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Nitrosodimethylamine (voor hoge concentraties van S9)	62-75-9	200-549-8
Benzo[a]pyreen		50-32-8	200-028-5	

Ook andere geschikte referentiestoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt, bijvoorbeeld 5-broom-2',deoxyuridine (CAS-nr. 59-14-3 en Einecs-nr. 200-415-9) als het laboratorium over referentiegegevens uit het verleden beschikt. Waar mogelijk dient het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle te worden overwogen.

Er dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de testgroepen worden behandeld.

Daarnaast moeten er ook controles worden gebruikt waaraan niets wordt toegediend, tenzij in het verleden reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

1.4.3. **Uitvoering**1.4.3.1. *Behandeling met de teststof*

Delende cellen worden zowel met als zonder metabole activering aan de teststof blootgesteld. De blootstelling moet gedurende een geschikte periode worden uitgevoerd (meestal is drie tot zes uur voldoende). De blootstelling kan een of meer celycli beslaan.

Voor elke concentratie kan de bepaling met één behandelde cultuur of in duplo worden uitgevoerd. Wanneer één cultuur wordt gebruikt, moet het aantal concentraties worden verhoogd om ervoor te zorgen dat een afdoende aantal culturen kan worden geanalyseerd (d.w.z. ten minste acht analyseerbare concentraties). Voor de negatieve controle (oplosmiddel) moeten duploculturen worden gebruikt.

Bij het testen van gassen of vluchtige stoffen moet een daarvoor geschikte methode worden gevolgd, bijvoorbeeld in een gesloten kweekvat (21) (22).

1.4.3.2. *Meting van de overleving, de levensvatbaarheid en de mutantfrequentie*

Aan het eind van de blootstellingsperiode worden de cellen gewassen en gekweekt om de overleving te bepalen en expressie van het mutantfenotype mogelijk te maken. Meestal wordt na de behandelingsperiode begonnen met de meting van de cytotoxiciteit door bepaling van de relatieve kloneringsefficiëntie (overleving) of de relatieve totale groei van de culturen.

Voor elke locus is er een bepaalde minimale tijd nodig om een vrijwel optimale fenotypische expressie van de geïnduceerde mutaties mogelijk te maken (voor HPRT en XPRT is ten minste zes tot acht dagen nodig en voor TK ten minste twee dagen). De cellen worden gekweekt in medium met en zonder de selecterende stof(fen) om respectievelijk het aantal mutanten en de kloneringsefficiëntie te bepalen. Aan het eind van de expressieperiode wordt een begin gemaakt met de meting van de levensvatbaarheid (gebruikt voor de berekening van de mutantfrequentie) door uitplating in het niet-selectieve medium.

Als de teststof positief reageert of de TK^{+/-} - test met L5178Y, moet bij ten minste een van de testculturen (de hoogste positieve concentratie) en bij de negatieve en positieve controles de grootte van de kolonies worden geïnventariseerd. Als de teststof negatief reageert op de TK^{+/-} - test met L5178Y, moet bij de negatieve en positieve controles de grootte van de kolonies worden geïnventariseerd. Als de TK^{+/-} - test met TK6 wordt gebruikt, kan de grootte van de kolonies ook worden geïnventariseerd.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

Er moeten gegevens worden verstrekt over de bepaling van de cytotoxiciteit en de levensvatbaarheid, het aantal kolonies en de mutantfrequentie bij de behandelde en de controreculturen. Als de teststof positief reageert op de TK^{+/-}-test met L5178Y, moeten de kolonies bij ten minste één concentratie van de teststof (de hoogste positieve concentratie) en bij de negatieve en positieve controles worden gescoord aan de hand van de criteria voor grote en kleine kolonies. Er is een gedetailleerde analyse gemaakt van de moleculaire en cytogenetische aard van zowel grote als kleine mutantkolonies (23) (24). Bij de TK^{+/-}-test worden de kolonies gescoord aan de hand van de criteria voor normale groei (grote kolonies) en langzame groei (kleine kolonies) (25). Mutantcellen die de omvangrijkste genetische beschadigingen hebben opgelopen, hebben een langere verdubbelingstijd en vormen derhalve kleine kolonies. De omvang van deze beschadiging varieert meestal van verlies van het hele gen tot karyotypisch zichtbare chromosoomafwijkingen. Er is een verband gelegd tussen mutanten met kleine kolonies en chemische stoffen die grootschalige chromosoomafwijkingen induceren (26). Minder ernstig aangetaste mutantcellen hebben een groeitempo dat vergelijkbaar is met de oudercellen en vormen grote kolonies.

De overleving (relatieve kloneringsefficiëntie) of de relatieve totale groei moet worden vermeld. De mutantfrequentie moet worden uitgedrukt als de verhouding tussen het aantal mutantcellen en het aantal overlevende cellen.

De gegevens moeten voor elke cultuur apart worden verstrekt. Daarnaast moet er een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden samengesteld.

Een duidelijk positieve reactie behoeft niet te worden bevestigd. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden. Negatieve resultaten moeten per geval worden bevestigd. Wanneer een bevestiging van negatieve resultaten niet nodig wordt geacht, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Bij vervollexperimenten na onduidelijke of negatieve resultaten dient wijziging van parameters te worden overwogen om de bepaling uit te breiden tot een breder scala van omstandigheden. Parameters die voor wijziging in aanmerking komen zijn bijvoorbeeld de concentratie-intervallen en de omstandigheden bij metabole activering.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een concentratieafhankelijke of een reproduceerbare stijging van de mutantfrequentie. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt. Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof in dit systeem als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste studies duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vitrogenmutatietest met zoogdiercellen wijzen erop dat de teststof in de gebruikte gekweekte zoogdiercellen genmutaties induceert. Het duidelijkst is een positieve concentratieafhankelijke respons die reproduceerbaar is. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in de gebruikte gekweekte zoogdiercellen geen genmutaties induceert.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel/Medium :

- motivering voor de keuze van het oplosmiddel/medium;
- oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Cellen :

- aard en herkomst van de cellen;
- aantal celculturen;
- aantal overenting, indien van toepassing;
- methoden om de celcultuur in leven te houden, indien van toepassing;
- afwezigheid van mycoplasma.

Testomstandigheden :

- achtergrond voor de keuze van de concentraties en het aantal culturen, bijvoorbeeld gegevens over de cytotoxiciteit en beperkte oplosbaarheid, indien beschikbaar;
- samenstelling van het medium, CO₂-concentratie;
- concentratie van de teststof;
- toegevoegd volume medium en teststof;
- incubatietemperatuur;
- incubatietijd;
- duur van de behandeling;
- celdichtheid bij de behandeling;
- aard en samenstelling van het metabool activeringssysteem, met inbegrip van aanvaardbaarheidscriteria;
- positieve en negatieve controles;
- lengte van de expressieperiode (met vermelding van het aantal geënte cellen en schema's voor enting en overenting, indien van toepassing);
- selecterende stoffen;
- criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is;
- methoden die zijn gebruikt om het aantal levensvatbare en mutantcellen te bepalen;
- definitie van kolonies van een bepaalde omvang en aard (bv. criteria voor « kleine » en « grote » kolonies).

Resultaten :

- tekenen van toxiciteit;
- neerslagverschijnselen;
- gegevens over de pH en de osmolaliteit tijdens de blootstelling aan de teststof, indien bepaald;
- grootte van een gescoorde kolonie voor ten minste de negatieve en positieve controles;
- mogelijkheden van het laboratorium voor de detectie van mutanten met een kleine kolonie bij de TK^{+/-} - test met L5178Y, indien van toepassing;
- indien mogelijk het verband tussen dosis en respons;
- eventuele statistische analyses;
- gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles;
- gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking;
- mutantfrequentie.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

(1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28 : Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E.H.Y. and Malling, H.V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells In Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, pp. 1306-1312.

(3) Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, Mutation Res., 94, pp. 467-485.

(4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, Mutagenesis, 4, pp. 394-403.

(5) Aaron, C.S., and Stankowski, Jr. L.F., (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays : Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, pp. 121-128.

(6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and 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, pp. 235-239.

(7) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, pp. 147-204.

(8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 115, pp. 225-251.

(9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and 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, pp. 17-36.

(10) Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., ÓNeill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F.Jr. and 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, pp. 135-141.

(11) Liber, H.L., Yandell, D.W. and 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, pp. 9-17.

(12) Stankowski, L.F.Jr., Tindall, K.R., and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate - and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate - and ICR-191 Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, pp. 133-147.

(13) Turner, N.T., Baltson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/ TK^{+/-} - TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In : Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.

(14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith J.C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In : Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, pp. 365-373.

(16) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, pp. 347-364.

(17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterisation of the L5178Y/ TK^{+/-} Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutat. Res., 59, pp. 61-108.

(18) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, pp. 173-215.

(19) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in : In Vitro Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and 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. and Philpot, R.M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(21) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooley, 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.

(22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and 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, pp. 795-801.

(23) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, pp. 51-55.

(24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT r) Mutants of L5178Y/ TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, pp. 161-174.

(25) Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. Mutation Res., 229, pp. 89-102.

(26) Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/ TK^{+/-} - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. Mutagenesis, 5, pp. 609-614. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,
Mevr. M. AELVOET

Bijlage IF

« B.23. TEST OP CHROMOSOOMAFWIJINGEN IN SPERMATOGONIA VAN ZOOGDIEREN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 483 van de OESO : Test op chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren (1997).

1.1. INLEIDING

De in vivotest op chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke stoffen structurele chromosoomafwijkingen in spermatogonia van zoogdieren veroorzaken (1) (2) (3) (4) (5). Er zijn twee soorten structurele afwijkingen : het chromosoomtype en het chromatidetype. De meeste chemische mutagenen veroorzaken afwijkingen van het chromatidetype, maar ook het chromosoomtype komt voor. Deze methode is niet bedoeld om numerieke afwijkingen te meten en wordt meestal niet voor dat doel gebruikt. Chromosoommutaties en soortgelijke voorvallen veroorzaken veel genetische ziekten bij de mens.

Bij deze test wordt gemeten wat er met de chromosomen van bepaalde kiemcellen (spermatogonia) gebeurt en op grond van het resultaat zullen wellicht voorspellingen kunnen worden gedaan over de inductie van erfelijke mutaties in kiemcellen.

Voor deze test worden meestal knaagdieren gebruikt. Het is een in vivo cytogenetische test waarbij chromosoomafwijkingen worden gedetecteerd die zich voordoen bij mitose van spermatogonia. De methode is niet geschikt voor andere doelweefsels.

Om afwijkingen van het chromatidetype in spermatogonia te detecteren, wordt de eerste mitose na de behandeling onderzocht, voordat deze beschadigingen bij latere celdelingen verloren gaan. Aanvullende informatie van behandelde spermatogoniastamcellen kan worden verkregen door de chromosomen bij de meiose te analyseren op afwijkingen van het chromosoomtype tijdens de diakinese-metafase I, wanneer de behandelde cellen spermatocyten worden.

Deze in vivotest is bedoeld om na te gaan of mutagenen voor somatische cellen ook in kiemcellen mutageen zijn. Daarnaast is de test met spermatogonia geschikt om het gevaar van mutagene effecten te evalueren, aangezien rekening kan worden gehouden met factoren die samenhangen met het metabolisme in vivo, de farmacokinetiek en de DNA-herstelsynthese.

De testis bevat een aantal generaties spermatogonia met een uiteenlopende gevoeligheid voor chemische stoffen. De geconstateerde afwijkingen vertegenwoordigen dan ook een gecombineerde respons van de behandelde spermatogoniacel populaties, waarbij de in grotere aantallen voorkomende gedifferentieerde spermatogonia overheersen. Afhankelijk van hun plaats binnen de testis kunnen verschillende generaties spermatogonia vanwege de fysische en fysiologische barrière van de cellen van Sertoli en de bloed-testisbarrière al dan niet via de grote bloedsomloop bereikbaar zijn.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof of een reactieve metabool daarvan niet in het doelweefsel terecht komt, is deze test niet geschikt.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Afwijking van het chromatidetype : structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in individuele chromatiden ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Afwijking van het chromosoomtype : structurele chromosoombeschadiging waarbij breuken in beide chromatiden op dezelfde plaats ontstaan, eventueel gevolgd door recombinatie.

Hiaat : een achromatische beschadiging die kleiner is dan de breedte van één chromatide en waarbij de fout in de uitlijning van de chromatiden minimaal is.

Numerieke afwijking : een verandering in het aantal chromosomen ten opzichte van het normale aantal dat kenmerkend is voor de gebruikte dieren.

Polyplöidie : het voorkomen van een ander veelvoud van het haploïde aantal chromosomen (n) dan het diploïde aantal (d.w.z. 3n, 4n, enz.).

Structurele afwijking : een verandering in de chromosoomstructuur die bij microscopisch onderzoek tijdens de metafase van de celdeling kan worden waargenomen in de vorm van deleties, fragmenten en intra- of interchromosomale uitwisselingen.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De dieren worden langs een geschikte weg aan de teststof blootgesteld en op geschikte tijdstippen na de behandeling gedood. Voordat de dieren worden gedood, worden ze behandeld met een metafasestopper (bv. colchicine of Colcemid®). Vervolgens worden chromosoompreparaten van de kiemcellen gemaakt, die worden gekleurd; de cellen in de metafase worden geanalyseerd op chromosoomafwijkingen.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. Voorbereiding

1.4.1.1. Keuze van de diersoort

Meestal worden mannetjes van Chinese hamsters of muizen gebruikt. Ook mannetjes van andere geschikte zoogdiersoorten komen echter in aanmerking. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen. Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal $\pm 20\%$ van het gemiddelde gewicht bedragen.

1.4.1.2. Huisvesting en voeding

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60 %.

1.4.1.3. Voorbereiding van de dieren.

Gezonde jonge volwassen mannetjes worden aselekt ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt.

De dieren krijgen een unieke identificatie. Ze krijgen minimaal vijf dagen de tijd om in het laboratorium te acclimatiseren voordat de test begint.

1.4.1.4. Bereiding van de doseringen

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. Testomstandigheden

1.4.2.1. Oplosmiddel/Medium

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosisniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

1.4.2.2. Controles

Bij elk experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt die in vivo structurele chromosoomafwijkingen in spermatogonia veroorzaakt bij toediening op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht.

De doseringen van de positieve controles moeten zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglaasjes niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof en slechts op één tijdstip te bemonsteren. Tevens kan waar mogelijk het gebruik van stoffen uit een verwante chemische klasse als positieve controle worden overwogen. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt :

Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Cyclofosfamide Cyclofosfamide monohydraat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Cyclohexylamine	108-91-8	203-629-0
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Acrylamide-monomeer	79-06-1	201-173-7
Triethyleenmelamine	51-18-3	200-083-5

Voor elk bemonsteringstijdstip dienen negatieve controles in het experiment te worden opgenomen, waaraan uitsluitend het oplosmiddel of het medium wordt toegediend en die verder op dezelfde manier als de andere groepen worden behandeld, tenzij uit in het verleden uitgevoerde controles aanvaardbare gegevens beschikbaar zijn over de spreiding over de dieren en de frequentie van cellen met chromosoomafwijkingen. Daarnaast moeten er ook onbehandelde controles worden gebruikt, tenzij in het verleden of in de literatuur reeds is aangetoond dat het gekozen oplosmiddel of medium geen schadelijke of mutagene effecten veroorzaakt.

1.5. UITVOERING

1.5.1. Aantal dieren

Elke behandelde en controlegroep moet minimaal vijf analyseerbare mannetjes bevatten.

1.5.2. Behandelingsschema

De teststof wordt bij voorkeur een of twee keer (d.w.z. als één of twee behandelingen) toegediend. De dosis kan eventueel worden gesplitst, waarbij de twee porties op dezelfde dag met een interval van niet meer dan enkele uren worden toegediend, om de toediening van een groot volume te vergemakkelijken. Voor een ander doseringsschema moet een wetenschappelijke motivering worden gegeven.

In de hoogste doseringsgroep worden twee bemonsteringstijdstippen na de behandeling gebruikt. Aangezien de kinetiek van de celcyclus door de teststof kan worden beïnvloed, wordt er één vroeg en één laat bemonsteringstijdstip gebruikt rond 24 en 48 uur na de behandeling. Voor andere doses dan de hoogste dosering moet een bemonsteringstijdstip op 24 uur of 1,5-maal de lengte van de celcyclus na de behandeling worden gekozen, tenzij bekend is dat een ander bemonsteringstijdstip geschikter is voor de detectie van effecten (6).

Daarnaast kunnen ook andere bemonsteringstijdstippen worden gebruikt. Een vroeger bemonsteringstijdstip zal bijvoorbeeld wellicht beter zijn bij stoffen die tot achterblijvende chromosomen kunnen leiden of S-onafhankelijke effecten kunnen hebben (1).

Per geval moet worden onderzocht of een schema voor herhaalde behandeling nodig is. Na herhaalde behandeling worden de dieren 24 uur (1,5-maal de lengte van de celcyclus) na de laatste behandeling gedood. Waar mogelijk kunnen aanvullende bemonsteringstijdstippen worden gebruikt.

Voordat de dieren worden gedood, worden ze intraperitoneaal geïnjecteerd met een adequate dosis metafasestopper (bv. Colcemid® of colchicine). De dieren worden na een adequate wachttijd bemonsterd. Voor muizen moet er ongeveer drie tot vijf uur worden gewacht en voor Chinese hamsters ongeveer vier tot vijf uur.

1.5.3. Dosisniveaus

Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens over de dosering beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek (7). Als er sprake is van toxiciteit, worden er voor het eerste bemonsteringstijdstip drie dosisniveaus gebruikt. Deze dosisniveaus moeten een interval van de maximale tot geen of vrijwel geen toxiciteit bestrijken. Op het latere bemonsteringstijdstip behoeft alleen de hoogste dosis te worden gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden.

Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit voor de spermatogonia oplevert (bv. een daling van de verhouding tussen cellen in spermatogoniamitose en eerste en tweede meiosemetafase; deze daling mag niet groter zijn dan 50 %).

1.5.4. Limiettest

Als een test met één dosis minimaal 2 000 mg/kg lichaamsgewicht/dag, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek met drie dosisniveaus uit te voeren. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

1.5.5. Toediening van de doses

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule of door intraperitoneale injectie toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven.

Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal heviger effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

1.5.6. Chromosoompreparaten

Onmiddellijk nadat het dier is gedood worden suspensies gemaakt van cellen uit één testis of beide testes en worden deze in een hypotone oplossing gebracht en gefixeerd. De cellen worden vervolgens op objectglaasjes uitgesmeerd en gekleurd.

1.5.7. Analyse

Voor elk dier worden minimaal 100 goed gespreide metafases geanalyseerd (d.w.z. ten minste 500 metafases per groep). Wanneer een groot aantal afwijkingen wordt geconstateerd, kan dit aantal worden verlaagd. Alle objectglaasjes, ook die van de positieve en negatieve controles, worden vóór de microscopische analyse onafhankelijk gecodeerd. Aangezien bij de fixatieprocedures vaak een gedeelte van de metafasecellen breekt, waarbij chromosomen verloren gaan, moeten de gescoorde cellen $2n \pm 2$ centromeren bevatten.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens moeten voor elk dier in tabelvorm worden verstrekt. De eenheid bij dit experiment is het dier.

Voor elk dier apart moet het aantal cellen met structurele chromosoomafwijkingen en het aantal chromosoomafwijkingen per cel worden bepaald. Er moet een overzicht worden gegeven van de verschillende soorten structurele chromosoomafwijkingen met de aantallen en de frequentie waarmee ze in de behandelde en controlegroepen voorkomen. Hiaten worden apart geregistreerd en gerapporteerd maar meestal niet in de totale frequentie van de afwijkingen opgenomen.

Als zowel mitose als meiose wordt geobserveerd, wordt als maat voor de cytotoxiciteit bij alle behandelde dieren en negatieve controles in een monster van in totaal 100 delende cellen per dier de verhouding tussen cellen in spermatogoniamitose en eerste en tweede meiosemetafase bepaald om een mogelijk cytotoxisch effect vast te stellen. Als alleen de mitose wordt geobserveerd, moet in ten minste 1 000 cellen voor elk dier de mitotische index worden bepaald.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Er zijn verschillende criteria om tot een positief resultaat te besluiten, zoals een dosisafhankelijke stijging van het relatieve aantal cellen met chromosoomafwijkingen of een duidelijke stijging van het aantal cellen met afwijkingen bij één dosis en één bemonsteringstijd. In eerste instantie moet naar de biologische relevantie van de resultaten worden gekeken. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt (8). Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn. Bij onduidelijke resultaten moet nader onderzoek worden gedaan, bij voorkeur onder gewijzigde experimentele omstandigheden.

Indien de resultaten voor een teststof niet aan bovenstaande criteria voldoen, wordt de stof bij deze test als niet-mutageen beschouwd.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de in-vivotest op chromosoomafwijkingen in spermatogonia wijzen erop dat de teststof in de kiemcellen van de geteste soort structurele chromosoomafwijkingen induceert. Negatieve resultaten wijzen erop dat de stof onder de testomstandigheden in de kiemcellen van de geteste soort geen chromosoomafwijkingen induceert.

De waarschijnlijkheid dat de teststof of de metaboliëten daarvan in het doelweefsel terechtkomen, dient te worden besproken.

3. RAPPORTAGE

TESTVERSLAG

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel/Medium

- Motivering voor de keuze van het medium.
- Oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Proefdieren :

- Gebruikte soort/stam.
- Aantal en leeftijd van de dieren.
- Herkomst, huisvesting, voeding, enz.
- Het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

Testomstandigheden :

- Gegevens uit het oriënterend onderzoek, indien dit is uitgevoerd.
- Achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus.
- Achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg.
- Gegevens over de bereiding van de teststof.
- Gegevens over de toediening van de teststof.
- Achtergrond voor de keuze van het tijdstip waarop de dieren gedood worden.
- Omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing.
- Gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater.
- Een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema.
- Methoden voor de meting van de toxiciteit.
- Naam van de metafasestopper, gebruikt concentratie en blootstellingsduur.
- Methoden voor de bereiding van de objectglaasjes.
- Criteria voor het scoren van afwijkingen.
- Aantal geanalyseerde cellen per dier.
- Criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten :

- Tekenen van toxiciteit.
- Mitotische index.
- Verhouding tussen cellen in spermatogoniamitose en eerste en tweede meiosemetafase.
- Aard en aantal van de afwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elk dier.
- Totaalaantal afwijkingen per groep.
- Aantal cellen met afwijkingen per groep.
- Indien mogelijk het verband tussen dosis en respons.
- Eventuele statistische analyses.
- Gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles.
- Gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve controles, met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.
- Gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde positieve controles.
- Veranderingen in de ploïdie, indien waargenomen.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

(1) Adler, I.D., (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In : Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B : Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (eds) Liss, New York, pp. 477-484.

(2) Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In : Mutagenicity Testing : a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E. (1964). An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, Cytogenetics and Cell Genetics, 3, pp. 289-294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990), In Vivo Cytogenetic Assays. In : D.J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, Mutation Res. 52, pp. 207-209.

(6) Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, pp. 313-318.

(7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group : Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.

(8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clarc, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage J.R.K. (1989). Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays. In : D.J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232. »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

Bijlage IG

« B.39. IN-VIVOTEST OP DNA-HERSTELSYNTHESE IN LEVERCELLEN VAN ZOOGDIEREN

1. METHODE

Deze methode is overgenomen van TG 486 van de OESO : In-vivotest op DNA-herstelsynthese in levercellen van zoogdieren (1997).

1.1. INLEIDING

De in-vivotest op DNA-herstelsynthese (unscheduled DNA synthesis - UDS) in levercellen van zoogdieren wordt gebruikt om te bepalen welke stoffen DNA-herstel in levercellen van behandelde dieren induceren (1) (2) (3) (4).

Deze in-vivotest maakt het mogelijk de genotoxische effecten van chemische stoffen in de lever te onderzoeken. Het gemeten eindpunt levert een indicatie op van de DNA-beschadiging en het herstel daarvan in levercellen. De lever is de plaats waar het metabolisme van geresorbeerde verbindingen zich meestal voor het grootste deel afspeelt en is derhalve een goede plaats om DNA-beschadiging in vivo te meten.

Als er aanwijzingen zijn dat de teststof niet in het doelweefsel terechtkomt, is deze test niet geschikt.

Het eindpunt van UDS wordt gemeten door bepaling van de opname van gelabelde nucleosiden in cellen waar geen geprogrammeerde DNA-synthese (in de S-fase) plaatsvindt. De meest gebruikte techniek is bepaling van de opname van met tritium gelabeld thymidine (³H-TdR) met behulp van autoradiografie. Bij een in vivo UDS-test wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van de rattenlever. Ook andere weefsels dan de lever kunnen worden gebruikt, maar daarvoor is deze methode niet geschikt.

De detectie van een UDS-respons is afhankelijk van het aantal DNA-basen dat op de beschadigde plaats wordt verwijderd en vervangen. De UDS-test is dan ook bijzonder geschikt voor de detectie van stoffen die leiden tot vervanging van grote stukken van 20-30 basen (« longpatch repair »). De gevoeligheid bij de detectie van « shortpatch repair », waarbij één tot drie basen worden vervangen, is daarentegen veel lager. Bovendien kunnen mutagene effecten een gevolg zijn van niet of verkeerd herstellende of verkeerd gerepliceerde DNA-beschadigingen. De intensiteit van de UDS-respons levert geen indicatie op omtrent de betrouwbaarheid van het herstelproces. Daarnaast is het mogelijk dat een mutagene stof met DNA reageert, maar dat de DNA-beschadiging niet via een excisieherstelproces wordt gerepareerd. De UDS-test levert dus niet veel specifieke informatie over een mutagene werking op, maar dit wordt gecompenseerd door de potentiële gevoeligheid van dit eindpunt omdat het in het hele genoom wordt gemeten.

Zie ook de algemene inleiding van deel B.

1.2. DEFINITIES

Cel in herstel : een cel met een hogere nettokernkorreling (NKK) dan een vooraf bepaalde waarde, waarvoor het laboratorium dat de test uitvoert een motivering moet geven.

Nettokernkorreling : een kwantitatieve maat voor de UDS-activiteit van cellen bij een UDS-test met autoradiografie, berekend door het gemiddelde aantal cytoplasmakorrels in kern-equivalente cytoplasmagebieden (CK) af te trekken van het aantal kernkorrels (KK) : $NKK = KK - CK$. De NKK wordt per cel apart berekend en vervolgens samengevoegd voor cellen in een cultuur, in parallelle culturen, enz.

DNA-herstelsynthese (unscheduled DNA synthesis - UDS) : herstelsynthese van DNA na excisie en verwijdering van een stuk DNA dat gedeeltelijk beschadigd is door een chemische stof of een fysisch agens.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De in vivo UDS-test in levercellen van zoogdieren levert een indicatie op van de herstelsynthese van DNA na excisie en verwijdering van een stuk DNA dat gedeeltelijk beschadigd is door een chemische stof of een fysisch agens. Meestal is de test gebaseerd op de inbouw van ³H-TdR in het DNA van levercellen met een geringe frequentie van cellen in de S-fase van de celcyclus. De opname van ³H-TdR wordt meestal bepaald met behulp van autoradiografie, aangezien deze techniek niet zo gevoelig is voor storing door cellen in de S-fase als bijvoorbeeld vloeistofscintillatietelling.

1.4. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. Voorbereiding

1.4.1.1. Keuze van de diersoort

Meestal worden ratten gebruikt, maar in principe komt elke geschikte zoogdiersoort in aanmerking. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde volwassen dieren van in het laboratorium gangbare stammen.

Bij het begin van de studie moet het gewichtsverschil tussen de dieren zo klein mogelijk zijn en mag dit maximaal ± 20 % van het gemiddelde gewicht van elk geslacht bedragen.

1.4.1.2. Huisvesting en voeding

De in de algemene inleiding van deel B genoemde algemene omstandigheden worden aangehouden, maar voor de luchtvochtigheid wordt gestreefd naar 50-60 %.

1.4.1.3. Voorbereiding van de dieren

Gezonde jonge volwassen dieren worden aselekt ingedeeld in de behandelde en controlegroepen. De kooien moeten zodanig worden geplaatst dat mogelijke effecten daarvan tot een minimum worden beperkt. De dieren krijgen een unieke identificatie en blijven voordat de test begint minimaal vijf dagen in hun kooi om in het laboratorium te acclimatiseren.

1.4.1.4. Teststof/Bereiding

Vaste teststoffen moeten in geschikte oplosmiddelen of media worden opgelost of gesuspenderd en eventueel vóór de toediening aan de dieren worden verdund. Vloeibare teststoffen kunnen rechtstreeks worden toegediend of vóór de toediening worden verdund. Tenzij uit stabiliteitsgegevens blijkt dat opslag aanvaardbaar is, moeten verse bereidingen van de teststof worden gebruikt.

1.4.2. Testomstandigheden

1.4.2.1. Oplosmiddel/Medium

Het oplosmiddel/medium mag bij de gebruikte dosiseniveaus geen toxische effecten veroorzaken en chemische reacties met de teststof moeten uitgesloten zijn. Als er andere dan gangbare oplosmiddelen/media worden gebruikt, moeten gegevens worden verstrekt waaruit blijkt dat ze geen problemen opleveren. Aanbevolen wordt waar mogelijk eerst te bezien of een waterig oplosmiddel/medium kan worden gebruikt.

1.4.2.2. Controles

In elk onafhankelijk uitgevoerd deel van het experiment moeten tegelijkertijd positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles worden uitgevoerd. Afgezien van de behandeling met de teststof moeten de dieren in de controlegroepen op identieke wijze worden behandeld als de dieren in de andere groepen.

Voor de positieve controles moet een stof worden gebruikt waarvan bekend is dat deze tot UDS leidt op een blootstellingsniveau waarbij een detecteerbare stijging ten opzichte van het achtergrondniveau kan worden verwacht. Wanneer voor een positieve controle metabole activering nodig is, moet de dosering zodanig worden gekozen dat de respons gematigd is (4). De doseringen kunnen zodanig worden gekozen dat de effecten duidelijk zijn maar de gecodeerde objectglazen niet onmiddellijk als zodanig herkenbaar zijn. Als positieve controle kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt :

Bemonsteringstijdstip	Stof	CAS-nr.	Einecs-nr.
Vroeg (2-4 uur)	N-Nitrosodimethylamine	62-75-9	200-249-8
Laat (12-16 uur)	N-Fluoreen-2-ylacetamide (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Ook andere geschikte stoffen kunnen als positieve controle worden gebruikt. Het is aanvaardbaar de positieve controle langs een andere weg toe te dienen dan de teststof.

1.5. UITVOERING

1.5.1. Aantal en geslacht van de dieren

Er moet een afdoende aantal dieren worden gebruikt om rekening te houden met de natuurlijke biologische variatie in de respons op de test. Elke groep moet minimaal drie analyseerbare dieren bevatten. Wanneer er een significant basisbestand met gegevens uit het verleden is opgebouwd, zijn er voor de gelijktijdige negatieve en positieve controlegroepen slechts één of twee dieren nodig.

Als er bij de uitvoering van de studie gegevens uit studies bij dezelfde soort en met dezelfde blootstellingsweg beschikbaar zijn waaruit blijkt dat er geen significante verschillen in toxiciteit tussen de geslachten zijn, is het voldoende de test bij één geslacht, bij voorkeur mannetjes, uit te voeren. Wanneer de blootstelling aan een chemische stof bij de mens door het geslacht wordt bepaald, zoals dit bijvoorbeeld bij sommige geneesmiddelen het geval is, moet de test bij dieren van het desbetreffende geslacht worden uitgevoerd.

1.5.2. Behandelingsschema

De teststof wordt in het algemeen in één behandeling toegediend.

1.5.3. Dosisniveaus

Normaal gesproken worden er ten minste twee dosisniveaus gebruikt. De hoogste dosis wordt gedefinieerd als de dosis die zodanige toxiciteitsverschijnselen veroorzaakt dat er bij hogere doses met hetzelfde doseringsschema waarschijnlijk sterfte zal optreden. In het algemeen wordt als laagste dosis 25-50 % van de hoogste dosis gebruikt.

Stoffen met een specifieke biologische activiteit bij lage niet-toxische doses (zoals hormonen en mitogenen) kunnen een uitzondering vormen op deze criteria om de dosering te bepalen en moeten per geval worden beoordeeld. Als er een oriënterend onderzoek wordt uitgevoerd omdat er geen bruikbare gegevens beschikbaar zijn, moet dit in hetzelfde laboratorium gebeuren met dezelfde soort, dezelfde stam, hetzelfde geslacht en hetzelfde behandelingsschema als bij het hoofdonderzoek.

De hoogste dosis kan ook worden gedefinieerd als een dosis die enigerlei aanwijzing van toxiciteit in de lever oplevert (bv. pyknotische kernen).

1.5.4. Limiettest

Als een test met één dosis van minimaal 2 000 mg/kg lichaamsgewicht, in één keer of in twee porties op dezelfde dag toegediend, geen waarneembare toxische effecten veroorzaakt en op basis van gegevens over stoffen met een verwante structuur geen genotoxiciteit te verwachten valt, zal het wellicht niet nodig zijn een volledig onderzoek uit te voeren. Op grond van gegevens omtrent de verwachte blootstelling van de mens kan het gebruik van een hoger dosisniveau bij de limiettest nodig worden geacht.

1.5.5. Toediening van de doses

De teststof wordt meestal met behulp van een maagsonde of een geschikte intubatiecanule toegediend. Ook andere toedieningswegen kunnen aanvaardbaar zijn, als daarvoor een motivering kan worden gegeven. Intraperitoneale toediening wordt echter niet aanbevolen, aangezien de lever dan rechtstreeks aan de teststof kan worden blootgesteld in plaats van via de bloedsomloop. Het maximale volume vloeistof dat in één keer met een sonde of injectie kan worden toegediend, is afhankelijk van de grootte van het proefdier. Het volume mag niet groter zijn dan 2 ml/100 g lichaamsgewicht. Voor het gebruik van grotere volumes moet een motivering worden gegeven. Behalve bij prikkelende of bijtende stoffen, die in hogere concentraties meestal heviger effecten veroorzaken, moeten volumeverschillen tot een minimum worden beperkt door de concentratie aan te passen, zodat op alle dosisniveaus hetzelfde volume kan worden gebruikt.

1.5.6. Levercelpreparaten

Normaal gesproken worden twaalf tot 16 uur na de toediening van de teststof levercelpreparaten van de behandelde dieren gemaakt. Meestal is ook een eerder bemonsteringstijdstip (normaal gesproken twee tot vier uur na de behandeling) nodig, tenzij er op twaalf tot 16 uur een duidelijke positieve reactie is. Er kunnen echter ook andere bemonsteringstijdstippen worden gebruikt, wanneer daarvoor op basis van toxicokinetische gegevens een motivering kan worden gegeven.

Meestal worden kortetermijnculturen van zoogdierlevercellen gemaakt door de lever in situ met collagenase te perfuseren en de net losgemaakte levercellen zich te laten hechten aan een geschikt oppervlak. De levercellen van dieren uit de negatieve controlegroep moeten een levensvatbaarheid (5) van ten minste 50 % hebben

1.5.7. Bepaling van de UDS

Net geïsoleerde zoogdierlevercellen worden gedurende een geschikte periode, bijvoorbeeld drie tot acht uur, geïncubeerd met een medium dat meestal $^3\text{H-TdR}$ bevat. Aan het eind van de incubatieperiode worden de cellen uit het medium verwijderd en kunnen ze vervolgens worden geïncubeerd met medium dat een overmaat ongelabeld thymidine bevat, om de niet ingebouwde radioactiviteit te verdrijven (« cold chase »). De cellen worden vervolgens gespoeld, gefixeerd en gedroogd. Bij een langduriger incubatietijd zal de « cold chase » wellicht niet nodig zijn. De objectglaasjes worden in autoradiografische emulsie gedoopt, in het donker belicht (bv. gekoeld gedurende zeven tot 14 dagen), ontwikkeld en gekleurd, waarna de belichte zilverkorrels worden geteld. Voor elk dier worden twee tot drie objectglaasjes geprepareerd.

1.5.8. Analyse

De geprepareerde objectglaasjes moeten voldoende cellen met een normale morfologie bevatten om een zinvolle bepaling van de UDS mogelijk te maken. De preparaten worden microscopisch onderzocht op tekenen van duidelijke cytotoxiciteit (bv. pyknose of een verlaagd gehalte aan het radioactieve isotoop).

De objectglaasjes worden vóór het tellen van de korrels gecodeerd. Normaal gesproken worden voor elk dier 100 cellen van ten minste twee objectglaasjes gescoord. Voor het scoren van minder dan 100 cellen per dier moet een motivering worden gegeven. Er worden geen korrels geteld bij cellen waarvan de kern in de S-fase is, maar het relatieve aantal cellen in de S-fase kan wel geregistreerd worden.

Met behulp van geschikte methoden wordt aan de hand van de neergeslagen zilverkorrels de hoeveelheid ingebouwd $^3\text{H-TdR}$ in de kern en het cytoplasma van morfologisch normale cellen bepaald.

2. GEGEVENS

2.1. BEHANDELING VAN DE RESULTATEN

De gegevens moeten voor elk objectglaasje en elk dier apart worden verstrekt. Daarnaast moet een overzicht van alle gegevens in tabelvorm worden gegeven. Voor elke cel, voor elk dier en voor elke dosis en tijd wordt de nettokernkorreling (NKK) berekend volgens de formule : $\text{NKK} = \text{KK} - \text{CK}$. Als het aantal « cellen in herstel » wordt geteld, moet een motivering worden gegeven voor de criteria voor de definitie van « cel in herstel » op basis van de resultaten bij in het verleden of tegelijkertijd uitgevoerde negatieve controles. De numerieke resultaten kunnen met behulp van statistische methoden worden geëvalueerd. Als statistische tests worden gebruikt, moeten deze vóór de uitvoering van het onderzoek worden gekozen en gemotiveerd.

2.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Criteria voor een positieve/negatieve respons zijn bijvoorbeeld :

Positief	i)	NKK-waarden boven een vooraf bepaalde drempelwaarde die op basis van gegevens van het laboratorium uit het verleden wordt gemotiveerd;
of	ii)	NKK-waarden die significant hoger zijn dan de gelijktijdige controle.
Negatief	i)	NKK-waarden binnen/onder de controledrempelwaarde uit het verleden;
of	ii)	NKK-waarden die niet significant hoger zijn dan de gelijktijdige controle.

Er moet naar de biologische relevantie van de gegevens worden gekeken. Daarbij moet bijvoorbeeld rekening worden gehouden met parameters als de spreiding over dieren, het verband tussen dosis en respons en de cytotoxiciteit. Als hulpmiddel bij de evaluatie van de testresultaten kunnen statistische methoden worden gebruikt. Statistische significantie mag echter niet de enige bepalende factor voor een positieve reactie zijn.

Hoewel de meeste experimenten duidelijk positieve of negatieve resultaten zullen opleveren, zal een definitieve uitspraak over de effecten van de teststof in uitzonderingsgevallen onmogelijk zijn. De resultaten kunnen, hoe vaak het experiment ook wordt herhaald, onduidelijk of twijfelachtig blijven.

Positieve resultaten bij de UDS-test met levercellen van zoogdieren in vivo wijzen erop dat een teststof in vivo DNA-beschadigingen in levercellen van zoogdieren induceert, die in vitro door DNA-herstelsynthese kunnen worden gerepareerd. Negatieve resultaten wijzen erop dat de teststof onder de testomstandigheden geen DNA-beschadigingen induceert die met deze test kunnen worden gedetecteerd.

De waarschijnlijkheid dat de teststof in de grote bloedsomloop of specifiek het doelweefsel terechtkomt (systemische toxiciteit), dient te worden besproken.

3. RAPPORTAGE**TESTVERSLAG**

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen :

Oplosmiddel/Medium :

- Motivering voor de keuze van het medium.
- Oplosbaarheid en stabiliteit van de teststof in het oplosmiddel/medium, indien bekend.

Proefdieren :

- Gebruikte soort/stam.
- Aantal, leeftijd en geslacht van de dieren.
- Herkomst, huisvesting, voeding, enz.
- Het gewicht van elk dier aan het begin van de test, met vermelding van de spreiding, het gemiddelde en de standaardafwijking van het lichaamsgewicht voor elke groep.

Testomstandigheden :

- Positieve en negatieve (oplosmiddel/medium) controles.
- Gegevens uit het oriënterende onderzoek, indien dit is uitgevoerd.
- Achtergrond voor de keuze van de dosisniveaus.
- Gegevens over de bereiding van de teststof.
- Gegevens over de toediening van de teststof.
- Achtergrond voor de keuze van de toedieningsweg.
- Methoden om na te gaan of de teststof in de grote bloedsomloop of het doelweefsel is terechtgekomen, indien van toepassing.
- Omrekening van de concentratie van de teststof in het voer/drinkwater (in ppm) in de feitelijke dosis (in mg/kg lichaamsgewicht/dag), indien van toepassing.
- Gegevens over de kwaliteit van het voer en het drinkwater.
- Een gedetailleerde beschrijving van het behandelings- en bemonsteringsschema.
- Methoden voor de meting van de toxiciteit.
- Methoden voor het kweken en prepareren van de levercellen.
- Gebruikte autoradiografietechniek.
- Aantal geprepareerde objectglasjes en aantal gescoorde cellen.
- Criteria voor de beoordeling.
- Criteria om te bepalen of het resultaat positief, negatief of onduidelijk is.

Resultaten :

- Waarden voor de kernkorrels, de cytoplasmakorrels en de nettokernkorreling voor elk objectglasje apart, gemiddeld voor elk dier en gemiddeld per groep.
- Indien beschikbaar het verband tussen dosis en respons.
- Eventuele statistische analyses.
- Tekenen van toxiciteit.
- Gegevens over tegelijkertijd uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles.
- Gegevens over in het verleden uitgevoerde negatieve (oplosmiddel/medium) en positieve controles, met vermelding van spreiding, gemiddelde en standaardafwijking.
- Aantal « cellen in herstel », indien bepaald.
- Aantal cellen in de S-fase, indien bepaald.
- Levensvatbaarheid van de cellen.

Bespreking van de resultaten.

Conclusies.

4. REFERENTIES

- (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, pp. 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, pp. 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. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, Mutation Res., 312, pp. 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, pp. 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, pp. 553-562.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

Bijlage II

« BIJLAGE IX

DEEL A

Bepalingen betreffende kinderveilige sluitingen

Naast de bepalingen in artikel 7, lid 1, onder e), van dit besluit dienen houders, die stoffen bevatten die gevaar bij verslikken opleveren (Xn; R65) en overeenkomstig punt 3.2.3 van bijlage VI bij dit besluit worden ingedeeld en gekenmerkt, ongeacht de hoeveelheid die zij kunnen bevatten, van een kinderveilige sluiting te worden voorzien, met uitzondering van stoffen die in de vorm van aerosolen of in een houder met een vaste verstuiver in de handel worden gebracht.

1. Hersluitbare verpakkingen

Kinderveilige sluitingen van hersluitbare verpakkingen moeten voldoen aan ISO-norm 8317 (uitgave 1 juli 1989) betreffende « Kinderveilige verpakkingen - Eisen en beproevingsmethoden ten aanzien van hersluitbare verpakkingen », vastgesteld door de Internationale Organisatie voor Normalisatie (ISO).

2. Niet-hersluitbare verpakkingen

Kinderveilige sluitingen van niet-hersluitbare verpakkingen moeten voldoen aan CEN-norm EN-862 (uitgave maart 1997) betreffende « Verpakkingen - Kinderveilige verpakkingen - Eisen en beproevingsmethoden ten aanzien van niet-hersluitbare verpakkingen voor niet-farmaceutische producten », vastgesteld door het Europees Comité voor Normalisatie (CEN).

3. Opmerkingen

1. Alleen laboratoria die aan de Europese normenreeks EN 45 000 voldoen, zijn bevoegd na te gaan of aan bovenstaande normen is voldaan.

2. Bijzondere gevallen

Indien het duidelijk is dat een verpakking in voldoende mate veilig is voor kinderen omdat kinderen niet bij de inhoud ervan kunnen komen zonder de hulp van een stuk gereedschap, hoeft de test niet te worden uitgevoerd.

In alle andere gevallen en wanneer er voldoende redenen zijn om aan de doeltreffendheid van de kinderveilige sluiting te twijfelen, kan de nationale autoriteit van degene die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen, een certificaat eisen dat is afgegeven door een laboratorium als bedoeld onder 3.1, waarin wordt verklaard dat :

— het toegepaste type sluiting zodanig is dat het niet noodzakelijk is om onderzoek volgens bovengenoemde ISO- of CEN-norm te verrichten,

of

— de sluiting is onderzocht en aan de voorschriften van bovengenoemde norm voldoet.

DEEL B

Bepalingen betreffende bij aanraking waarneembare gevaarsaanduidingen

De technische specificaties voor bij aanraking waarneembare gevaarsaanduidingen moeten voldoen aan EN ISO-norm 11683 (uitgave 1997) betreffende « Verpakkingen - Bij aanraking waarneembare gevaarsaanduidingen - Eisen » ».

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 11 juli 2001.

ALBERT

Van Koningswege :