

Sommaire

I Actes dont la publication est une condition de leur applicabilité

- ★ **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⁽¹⁾** 1
- ★ **Directive 2000/33/CE de la Commission du 25 avril 2000 portant vingt-septième 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⁽¹⁾** 90

II Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité

Commission

2000/368/CE:

- ★ **Décision de la Commission, du 19 mai 2000, rectifiant la directive 98/98/CE portant vingt-cinquième 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⁽¹⁾ [notifiée sous le numéro C(2000) 1333]** 108

Prix: 24,50 EUR

⁽¹⁾ Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE.**FR**

Les actes dont les titres sont imprimés en caractères maigres sont des actes de gestion courante pris dans le cadre de la politique agricole et ayant généralement une durée de validité limitée.

Les actes dont les titres sont imprimés en caractères gras et précédés d'un astérisque sont tous les autres actes.

I

(Actes dont la publication est une condition de leur applicabilité)

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(*)

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu la directive 67/548/CEE du Conseil du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses⁽¹⁾, modifiée en dernier lieu par la directive 1999/33/CE du Parlement européen et du Conseil⁽²⁾, et notamment son article 28,

considérant ce qui suit:

- (1) L'annexe I de la directive 67/548/CEE contient une liste de substances dangereuses, ainsi que des spécifications de classification et d'étiquetage pour chaque substance. Les connaissances scientifiques et techniques actuelles ont montré que la liste des substances dangereuses figurant à ladite annexe doit être adaptée. Certaines parties de l'avant-propos et du tableau A de l'annexe I doivent être modifiées dans certaines versions linguistiques.
- (2) L'annexe III de la directive 67/548/CEE contient une liste de phrases indiquant la nature des risques particuliers imputés aux substances et préparations dangereuses. L'annexe IV de la directive 67/548/CEE contient une liste de conseils de prudence concernant les substances et préparations dangereuses. L'annexe VI de la directive 67/548/CEE contient un guide pour la classification et l'emballage des substances et préparations dangereuses. Certaines parties des annexes III, IV et VI doivent être modifiées dans certaines versions linguistiques.
- (3) L'annexe V de la directive 67/548/CEE définit les méthodes permettant de déterminer les propriétés physico-chimiques, la toxicité et l'écotoxicité des substances et préparations. L'adaptation au progrès technique de cette annexe est nécessaire.

(4) L'annexe IX de la directive 67/548/CEE contient les dispositions concernant les fermetures de sécurité pour les enfants. Ces dispositions doivent être adaptées et mises à jour. Il est nécessaire d'étendre le champ d'application des fermetures de sécurité pour les enfants.

(5) Les mesures prévues par la présente directive sont conformes à l'avis du comité pour l'adaptation au progrès technique des directives visant à l'élimination des entraves techniques aux échanges dans le secteur des substances et préparations dangereuses,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

Article premier

La directive 67/548/CEE est modifiée comme suit.

1. L'annexe I est modifiée comme suit.
 - a) La note Q de l'annexe 1 A de la présente directive remplace la note correspondante de l'avant-propos.
 - b) Les lignes du tableau figurant à l'annexe 1 B de la présente directive remplacent les lignes correspondantes du tableau A.
 - c) Les entrées de l'annexe 1 C de la présente directive remplacent les entrées correspondantes.
 - d) Les entrées de l'annexe 1 D de la présente directive sont ajoutées.
2. La phrase de risque figurant à l'annexe 2 de la présente directive remplace la phrase correspondante de l'annexe III.
3. L'annexe IV est modifiée comme suit.
 - a) Les conseils de prudence de l'annexe 3 A de la présente directive remplacent les phrases correspondantes de l'annexe IV.

(*) Adoptée après la vingt-septième adaptation.

⁽¹⁾ JO 196 du 16.8.1967, p. 1.

⁽²⁾ JO L 199 du 30.7.1999, p. 57.

- b) Les conseils de prudence combinés figurant à l'annexe 3 B de la présente directive remplacent les phrases correspondantes de l'annexe IV.
4. La partie B de l'annexe V est modifiée comme suit.
- a) Le texte de l'annexe 4 A de la présente directive remplace le chapitre B.10.
- b) Le texte de l'annexe 4 B de la présente directive remplace le chapitre B.11.
- c) Le texte de l'annexe 4 C de la présente directive remplace le chapitre B.12.
- d) Le texte de l'annexe 4 D de la présente directive remplace les chapitres B.13 et B.14.
- e) Le texte de l'annexe 4 E de la présente directive remplace le chapitre B.17.
- f) Le texte de l'annexe 4 F de la présente directive 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 4 G de la présente directive est ajouté.
5. Le quatrième tiret de l'introduction générale de la partie C de l'annexe V est supprimé.
6. Les textes de l'annexe 5 de la présente directive remplacent les textes correspondants de l'annexe VI.
7. L'annexe IX est modifiée conformément à l'annexe 6 de la présente directive.

Article 2

1. Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer à la présente directive au plus tard le 1^{er} juin 2001. Ils en informent immédiatement la Commission.

Lorsque les États membres adoptent ces dispositions, celles-ci contiennent une référence à la présente directive ou sont accompagnées d'une telle référence lors de leur publication officielle. Les modalités de cette référence sont arrêtées par les États membres.

2. Les États membres communiquent à la Commission les principales dispositions législatives de droit national qu'ils adoptent dans le secteur concerné par la présente directive et un tableau de correspondance entre la présente directive et les dispositions nationales adoptées.

Article 3

La présente directive entre en vigueur le troisième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*.

Article 4

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 19 mai 2000.

Par la Commission
Margot WALLSTRÖM
Membre de la Commission

ANNEXE 1A

AVANT-PROPOS À L'ANNEXE I

Explication des notes relatives à l'identification, à la classification et à l'étiquetage des substances

DA:

Note Q:

Klassificeringen som kræftfremkaldende kan udelades for fibre, som opfylder en af følgende betingelser:

- en kortvarig biopersistensprøve ved inhalation har vist, at fibre, der er længere end 20 µm, har en vægтет halveringstid på mindre end 10 dage
- en kortvarig biopersistensprøve ved intratrakeal instillation har vist, at fibre, der er længere end 20 µm, har en vægтет halveringstid på mindre end 40 dage
- en egnet intra-peritoneal prøve ikke har vist kræftfremkaldende virkning, eller
- en egnet langvarig inhalationsprøve ikke har vist relevante sygdomsfremkaldende virkninger eller neoplastiske forandringer.

SV:

Note Q:

Ämnet behöver inte klassificeras som cancerframkallande om det kan visas att det uppfyller ett av följande villkor:

- ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid inhalation har visat att fibrer längre än 20 µm har en viktad halveringstid på mindre än 10 dagar
- ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid intratrakeal instillation har visat att fibrer längre än 20 µm har en viktad halveringstid på mindre än 40 dagar
- ett lämpligt intraperitonealt test har inte givit belägg för förhöjd cancerogenitet
- frånvaro av relevant patogenitet eller neoplastiska förändringar i ett lämpligt långtids inhalationstest.

(Ne concerne pas la version ES)

(Ne concerne pas la version DE)

(Ne concerne pas la version EL)

(Ne concerne pas la version EN)

(Ne concerne pas la version FR)

(Ne concerne pas la version IT)

(Ne concerne pas la version NL)

(Ne concerne pas la version PT)

(Ne concerne pas la version FI)

ANNEXE I B

TABLEAU A

Z	Symb.	ES	DA	DE	EL	EN	FI	FR	IT	NL	PT	SV
«18	Ar	Argón	Argon	Argon	Αργό	Argon	Argon	Argon	Argon	Argon	Árgon	Argon»
«64	Gd	Gadolinio	Gadolinium	Gadolinium	Γαδολίβιο	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinio	Gadolinium	Gadólínió	Gadolinium»

ANNEXE I C

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
006-011-00-7	carbaryl (ISO) méthylcarbamate de 1-naphthyle		200-555-0	63-25-2	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-40-50 S: (2-22-24-36/37-46-61		
006-013-00-8	métam-sodium (ISO) N-méthylthiocarbamate de sodium		205-293-0	137-42-8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-31-34-43-50/53 S: (1/2-26-36/37/39-45-60-61		
006-015-00-9	diuron (ISO) 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée		206-354-4	330-54-1	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-48/22-50/53 S: (2-13-22-23-37-46-60-61		
006-016-00-4	propoxur (ISO) N-méthylcarbamate de 2-isopropoxyphényle		204-043-8	114-26-1	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)37-45-60-61		
006-017-00-X	aldicarbe (ISO) 2-méthyl-2-(méthylthio) propionaldéhyde- O-(méthylcarbamoyl) oxime N-méthylcarbamate de (2-méthyl-2-méthylthio- propylidène) amine		204-123-2	116-06-3	T+; R26/28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2)22-36/37-45-60-61		
006-018-00-5	aminocarbe (ISO) méthylcarbamate de 4-diméthylamino-3-tolyle		217-990-7	2032-59-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2)28-36/37-45-60-61		
006-019-00-0	diallate (ISO) diisopropylthiocarbamate de S-2,3-dichlorallyle		218-961-1	2303-16-4	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-25-36/37-60-61		
006-020-00-6	barbane (ISO) 3-chlorophénylcarbamate de 4-chlorobut- 2-ynyle		202-930-4	101-27-9	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-24-36/37-60-61		
006-023-00-2	mercaptopdiméthur (ISO) méthiocarbe méthylcarbamate de 4-méthylthio-3,5-xylyle N-méthylcarbamate de 3,5-diméthyl-4-méthylthiophényle		217-991-2	2032-65-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)22-37-45-60-61		
006-024-00-8	proxane-sodium (ISO) dithiocarbonate d'O-isopropyle et de sodium		205-443-5	140-93-2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-51/53 S: (2-13-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
006-026-00-9	carbofuran (ISO) méthylcarbamate de 2,3-dihydro-2,2-diméthylbenzofuran-7-yle		216-353-0	1563-66-2	T+; R26/28 N; R50-53	T+; N R: 26/28-50/53 S: (1/2)36/37-45-60-61		
006-028-00-X	dinobuton (ISO) carbonate de 2-sec-butyl-4,6-dinitrophényle et d'isopropyle		213-546-1	973-21-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)37-45-60-61		
006-029-00-5	dioxacarbe (ISO) méthylcarbamate de 2-(1,3-dioxolan-2-yl)phényle		230-253-4	6988-21-2	T; R25 N; R51-53	T; N R: 25-51/53 S: (1/2)37-45-61		
006-033-00-7	métoxuron (ISO) N-(3-chloro-4-méthoxyphényl)-N,N-diméthylurée		243-433-2	19937-59-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
006-034-00-2	pébulate (ISO) butyl (éthyl) thiocarbamate de S-propyle		214-215-4	1114-71-2	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2)23-61		
006-035-00-8	pyrimicarbe (ISO) N,N-diméthylcarbamate de 2-diméthylamino-5,6-diméthyl-4-pyrimidinyle		245-430-1	23103-98-2	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)22-37-45-60-61		
006-037-00-9	promécarbe (ISO) N-méthylcarbamate de 3-isopropyl-5-méthylphényle		220-113-0	2631-37-0	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)24-37-45-60-61		
006-038-00-4	sulfallate (ISO) diéthylthiocarbamate de 2-chlorallyle	E	202-388-9	95-06-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61		
006-039-00-X	triallate (ISO) diisopropylthiocarbamate de S-2,3-trichlorallyle		218-962-7	2303-17-5	Xn; R22-48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2)24-37-60-61		
006-042-00-6	monuron (ISO) 3-(4-chlorophényl)-1,1-diméthylurée		205-766-1	150-68-5	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2)36/37-60-61		
006-043-00-1	monuron-TCA trichloroacétate de 3-(4-chlorophényl)-1,1-diméthyluronium		—	140-41-0	Xi; R36/38 Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 36/38-40-50/53 S: (2)36/37-60-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
006-045-00-2	méthomyl (ISO) N-(méthylcarbamoxy)thioacétimide de S-méthyle		240-815-0	16752-77-5	T+; R28 N; R50-53	T+; N R: 28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-046-00-8	bendiocarbe (ISO) méthylcarbamate de 2,2-diméthyl-1,3-benzodioxole-4-yle		245-216-8	22781-23-3	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-047-00-3	bufencarbe (ISO) méthylcarbamate de 3-(1-méthylbutyl)phényle-méthylcarbamate de 3-(1-éthylpropyl)phényle (3:1)		—	8065-36-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-048-00-9	éthiophencarbe (ISO) N-méthylcarbamate de 2-éthylthiométhylphényle		249-981-9	29973-13-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-050-00-X	fénuron-TCA trichloroacétate de 1,1-diméthylphényluronium		—	4482-55-7	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)60-61		
006-053-00-6	isoprocarbe (ISO) méthylcarbamate de o-cuményle		220-114-6	2631-40-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
006-054-00-1	méxacarbe (ISO) méthylcarbamate de 4-diméthylamino-3,5-xyle		206-249-3	315-18-4	T+; R28 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
006-057-00-8	nitrapyrine (ISO) 2-chloro-6-trichlorméthylpyridine		217-682-2	1929-82-4	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)24-61		
006-060-00-4	oxycarboxine (ISO) 5,6-dihydro-2-méthyl-1,4-oxathiine-3-carboxanilide-4,4-dioxyde 2,3-dihydro-6-méthyl-5-(phénylcarbamoyle)-1,4-oxathiine 4,4-dioxyde		226-066-2	5259-88-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
006-069-00-3	thiophanate-méthyl (ISO) 4,4'-(O-phénylène)bis(3-thioallophanate) de diméthyle		245-750-7	23564-05-8	Muta- Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-070-00-9	furmecycloz N-cyclohexyl-N-méthoxy-2,5-diméthyl-3-furamide		262-302-0	60568-05-0	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
006-088-00-7	benfuracarbe (ISO) N-[2,3-Dihydro-2,2-diméthylbenzofurane-7-yloxy-carbonyl(méthylaminothio)]-N-isopropyl-b-alanilate d'éthyle		—	82560-54-1	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
007-012-00-5	N,N-diméthylhydrazine	E	200-316-0	57-14-7	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 C; R34 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23/25-34-51/53 S: 53-45-61		
007-013-00-0	1,2-diméthylhydrazine	E	—	540-73-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25%: T; R45-23/24/25 3% ≤ C < 25%: T; R45-20/21/22 0,01% ≤ C < 3%: T; R45	
009-003-00-1	acide fluorhydrique ... %	B	231-634-8	7664-39-3	T+; R26/27/28 C; R35	T+; C R: 26/27/28-35 S: (1/2-)7/9-26-36/37-45	C ≥ 7%: T+; C; R26/27/28-35 1% ≤ C < 7%: T; R23/24/25-34 0,1% ≤ C < 1%: Xn; R20/21/22-36/37/38	
015-039-00-9	azinphos-méthyl (ISO) dithiophosphate de O,O-diméthyle et de 4-oxo-benzotriazine-3-ylméthyle		201-676-1	86-50-0	T+; R26/28 T; R24 R43 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-43-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-048-00-8	fenthion (ISO) thiophosphate de O,O-diméthyle et de O-(4-méthylthio-m-tolyle)		200-231-9	55-38-9	Muta. Cat. 3; R40 T; R23-48/25 Xn; R21/22 N; R50-53	T; N R: 21/22-23-40-48/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
015-056-00-1	azinphos-éthyl (ISO) dithiophosphate de O,O-diéthyle et de 4-oxo-benzotriazine-3-ylméthyle		220-147-6	2642-71-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-140-00-8	triazophos (ISO) thiophosphate de O,O-diéthyle et de O-1-phényl-1,2,4-triazole-3-yle		245-986-5	24017-47-8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
016-013-00-X	dichlorure de soufre		234-129-0	10545-99-0	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
016-014-00-5	tétrachlorure de soufre		—	13451-08-6	R14 C: R34 N: R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-2)26-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C: R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
016-023-00-4	sulfate de diméthyle	E	201-058-1	77-78-1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T+; R26 T; R25 C: R34 R43	T+ R: 45-25-26-34-43 S: 53-45	C ≥ 25%: T+; R45-25-26-34-43 10% ≤ C < 25%: T+; R45-22-26-34-43 7% ≤ C < 10%: T+; R45-22-26-36/37/38-43 5% ≤ C < 7%: T; R45-22-23-36/37/38-43 3% ≤ C < 5%: T; R45-22-23-43 1% ≤ C < 3%: T; R45-23-43 0,1% ≤ C < 1%: T; R45-20 0,01% ≤ C < 0,1%: T; R45	
016-024-00-X	dimexano (ISO) disulfure de bis(méthoxy-thiocarbonyle)		215-993-8	1468-37-7	Xn; R22 N: R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-1)60-61		
016-071-00-6	3-amino-6,13-dichloro-10-((3-(4-chloro-6-(2-sulphophénylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)amino)propyl)amino)-4,11-triphénoxydioxazinedisulfonate de trisodium		410-130-3	136248-03-8	R43	Xi R: 43 S: (2-2)22-24-37		
022-001-00-5	tétrachlorure de titane		231-441-9	7550-45-0	R14 C: R34	C R: 14-34 S: (1/2-7)8-26-36/37/39-45	C ≥ 10%: C: R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
030-004-00-8	diméthylzinc [1] diéthylzinc [2]		208-884-1 [1] 209-161-3 [2]	544-97-8 [1] 557-20-0 [2]	R14 F: R17 C: R34 N: R50-53	F; C; N R: 14-17-34-50/53 S: (1/2-1)6-43-45-60-61		
050-002-00-0	cyhénatín (ISO) hydroxyde de tri(cyclohexyl)étain		236-049-1	13121-70-5	Xn; R20/21/22 N: R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-1)3-60-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
050-012-00-5	tétracyclohexylstannane [1] chlorotricyclohexylstannane [2] butyltricyclohexylstannane [3]		215-910-5 [1] 221-437-5 [2] 230-358-5 [3]	1449-55-4 [1] 3091-32-5 [2] 7067-44-9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 1 %; Xn; R20/21/22	1
050-017-00-2	fenbutatin oxyde (ISO) oxyde de bis(tri(2-méthyl-2-phénylpropyl)étain]		236-407-7	13356-08-6	T+; R26 Xi; R36/38 N; R50/53	T+; N R: 26-36/38-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
082-009-00-X	jaune de sulfochromate de plomb C.I. Pigment Yellow 34 (Cette substance est répertoriée dans le Colour Index sous le Colour Index Constitution Number C.I. 77603.)		215-693-7	1344-37-2	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
082-010-00-5	rouge de chromate, de molybdate et de sulfate de plomb C.I. Pigment Red 104 (Cette substance est répertoriée dans le Colour Index sous le Colour Index Constitution Number C.I. 77605.)		235-759-9	12656-85-8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
601-024-00-X	cumène [1] propylbenzène [2]		202-704-5 [1] 203-132-9 [2]	98-82-8 [1] 103-65-1 [2]	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51-53	Xn; N R: 10-37-51/53-65 S: (2-)24-37-61-62		4
601-032-00-3	benzo[a]pyrène benzo[<i>def</i>]chrysène		200-028-5	50-32-8	Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 N; R50-53	T; N R: 45-46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
601-034-00-4	benzo[e]acephénanthrylène		205-911-9	205-99-2	Carc. Cat.2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
602-035-00-2	1,4-dichlorobenzène <i>p</i> -dichlorobenzène		203-400-5	106-46-7	Xi; R36 N; R50-53	Xi; N R: 36-50/53 S: (2-)24/25-46-60-61		
602-054-00-6	3-iodopropène iodure d'allyle		209-130-4	556-56-9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2-)7-26-45		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
603-076-00-9	but-2-yne-1,4-diol 2-butyn-1,4-diol		203-788-6	110-65-6	T; R23/25 Xn; R21-48/22 C; R34	T R: 21-23/25-34-48/22 S: (1/2)/26-36/37/39-45	C ≥ 50%; T; R21-23/25-34-48/22 25% ≤ C < 50%; T; R21-23/25-36/38-48/22 10% ≤ C < 25%; Xn; R20/22-48/22 3% ≤ C < 10%; Xn; R20/22	
603-091-00-0	exo-1-méthyl-4-(1-méthyléthyl)-7-oxabicyclo[2.2.1]heptan-2-ol		402-470-6	87172-89-2	O; R8 Xn; R22 Xi; R36	O; Xn R: 8-22-36 S: (2)/26		
603-093-00-1	exo-(+/-)-1-méthyl-4-(1-méthyléthyl)-2-[(2-méthylphényl)méthoxy]-7-oxabicyclo[2.2.1]heptane		402-410-9	87818-31-3	Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 20-51/53 S: (2)/23-61		
603-097-00-3	1,1',1''-nitriilotripropane-2-ol		204-528-4	122-20-3	Xi; R36 R52-53	Xi R: 36-52/53 S: (2)/26-61		
603-117-00-0	propane-2-ol alcool isopropylique		200-661-7	67-63-0	F; R11 Xi; R36 R67	F; Xi R: 11-36-67 S: (2)/7-16-24/25-26		6
604-020-00-6	2-phénylphénol (ISO) biphényl-2-ol 2-hydroxybiphényle orthophénylphénol		201-993-5	90-43-7	Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 36/37/38-50 S: (2)/22-61		
604-021-00-1	orthophénylphénate de sodium 2-biphénylate de sodium		205-055-6	132-27-4	Xn; R22 Xi; R37/38-41 N; R50	Xn; N R: 37/38-41-50 S: (2)/22-26-61		
604-024-00-8	4,4'-isobutyléthylidenediphénol		401-720-1	6807-17-6	Repr. Cat. 2; R60 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 60-36-50/53 S: 53-45-60-61		
604-041-00-0	acfluorène [1] acfluorène-sodium [2] acide 5-[2-chloro-4-(trifluorométhyl)phénoxy]-2-nitrobenzoïque [1] 5-[2-chloro-4-(trifluorométhyl)phénoxy]-2-nitrobenzoate de sodium [2]		256-634-5 [1] 263-560-7 [2]	50594-66-6 [1] 62476-59-9 [2]	Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2)/24-39-60-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
604-043-00-1	monobenzene 4-benzoyloxyphénol éther monobenzylrique de l'hydroquinone		203-083-3	103-16-2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25-26-37		
604-044-00-7	mequinol 4-méthoxyphénol éther monométhylrique de l'hydroquinone		205-769-8	150-76-5	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)24/25-26-37/39-46		
605-016-00-7	glyoxal ...% éthanedial ...%	B	203-474-9	107-22-2	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20-36/38-40-43 S: (2-)36/37	C ≥ 10%: Xn; R20-36/38-40-43 1% ≤ C < 10%: Xn; R40-43	
606-016-00-X	pindone (ISO) pivaldione 2-pivaloylindane-1,3-dione		201-462-8	83-26-1	T; R25-48/25 N; R50-53	T; N R: 25-48/25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
606-018-00-0	dichlone (ISO) 2,3-dichloro-1,4-naphtoquinone		204-210-5	117-80-6	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-)26-60-61		
606-019-00-6	chlordécone (ISO) décachloropentacyclo[5,2,1,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{5,8}] décane-4-one		205-601-3	143-50-0	Carc. Cat. 3; R40 T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-40-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
606-034-00-8	métribuzine (ISO) 4-amino-6-tert-butyl-3-méthylthio-1,2,4- triazine-5(4H)-one		244-209-7	21087-64-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
606-035-00-3	chlondazone (ISO) 5-amino-4-chloro-2-phénylpyridazine-3-(2H)- one pyrazon		216-920-2	1698-60-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
606-036-00-9	chinométhionate (ISO) 6-méthyl-1,3-dithiolo(4,5-b)quinoxaline-2-one		219-455-3	2439-01-2	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/21/22-48/22 Xi; R36 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-36-43-48/22-50/ 53-62 S: (2-)24-37-60-61		
606-037-00-4	triadiméfon (ISO) 1-(4-chlorophénoxy)-3,3-diméthyl-1-(1,2,4-tria- zole-1-yl)butanone		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
606-044-00-2	2,4,6-triméthylbenzophénone		403-150-9	954-16-5	Xn; R22 Xi; R36 N; R50-53	Xn; N R: 22-36-50/53 S: (2)-26-60-61		
607-043-00-X	dicamba (ISO) acide 3,6-dichloro-2-méthoxybenzoïque		217-635-6	1918-00-9	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn; N R: 22-41-52/53 S: (2)-26-61		
607-057-00-6	coumachlore (ISO) 3-(1-(4-chlorophényl)-3-oxobutyl)-4-hydroxy-coumarine		201-378-1	81-82-3	Xn; R48/22 R52-53	Xn R: 48/22-52/53 S: (2)-37-61		
607-058-00-1	coumafuryl (ISO) 3-[1-(2-furyl)-3-oxo-butyl]-4-hydroxycoumarine		204-195-5	117-52-2	T; R25-48/25 R52-53	T R: 25-48/25-52/53 S: (1/2)-37-45-61		
607-079-00-6	kélévane (ISO) 5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-décachloro-4-hydroxypentacyclo[5,2,1,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{5,8}]dec-4-yl)-4-oxovalérate d'éthyle		—	4234-79-1	T; R24 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 22-24-51/53 S: (1/2)-36/37-45-61		
607-097-00-4	1,2-anhydride de l'acide benzène-1,2,4-tricarboxylique anhydride trimellitique		209-008-0	552-30-7	Xi; R37-41 R42/43	Xn R: 37-41-42/43 S: (2)-22-26-36/37/39		
607-143-00-3	acide valérique		203-677-2	109-52-4	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2)-26-36-45-61		
607-152-00-2	2,3,6-TBA (ISO) acide 2,3,6-trichlorobenzoïque		200-026-4	50-31-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2)-61		
607-153-00-8	bénazoline (ISO) acide 4-chloro-2-oxobenzothiazoline-3-ylacétique		223-297-0	3813-05-6	Xi; R36/38 R52-53	Xi R: 36/38-52/53 S: (2)-22-61		
607-156-00-4	chlorofénizon (ISO) 4-chlorobenzènesulfonate de 4-chlorophényle		201-270-4	80-33-1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-50/53 S: (2)-37-60-61		
607-158-00-5	sel de sodium de l'acide chloroacétique chloroacétate de sodium		223-498-3	3926-62-3	T; R25 Xi; R38 N; R50	T; N R: 25-38-50 S: (1/2)-22-37-45-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
607-159-00-0	chlorobenzilate (ISO) 4,4'-dichlorobenzilate d'éthyle		208-110-2	510-15-6	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
607-176-00-3	Mélange de: α -3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxyphényl)propionyl- ω -hydroxypropyl(oxyéthylène); α -3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxyphényl)propionyl- ω -3-(3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-tert-butyl-4-hydroxyphényl)propionyl(oxyéthylène)		400-830-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-36/37-61		
607-188-00-9	N-carboxylatoéthyl-N-octadéc-9-énylmaléamate d'hydrogène et de sodium		402-970-4	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24/37-61		
607-209-00-1	Mélange de: O,O-di(1-méthyléthyl)trithio-bis-thioformate; O,O-di(1-méthyléthyl)tétrathio-bis-thioformate; O,O-di(1-méthyléthyl)pentathio-bis-thioformate		403-030-6	—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)-36/37-60-61		
607-213-00-3	3,3-bis[(1,1-diméthylpropyl)péroxy]butyrate d'éthyle		403-320-2	67567-23-1	E; R2 O; R7 R10 N; R51-53	E; N R: 2-7-10-51/53 S: (2)-3/7-14-3-3-36/37/39-61		
607-217-00-5	2-[4-(2,6-dihydro-2,6-dioxo-7-phényl-1,5-dioxaindancén-3-yl)phénoxy]acétate de 2-éthoxyéthyle		403-960-2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2)-24-37-61		
607-243-00-7	3,6-dichloro-o-anisate de sodium [1] acide 3,6-dichloro-o-anisique, composé avec 2,2'-iminodichéanol (1:1) [2] acide 3,6-dichloro-o-anisique, composé avec 2-amioéthanol (1:1) [3]	217-846-3 [1] 246-590-5 [2] 258-527-9 [3]		1982-69-0 [1] 25059-78-3 [2] 53404-28-7 [3]	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-248-00-4	naphtalène-sodium		205-073-4	132-67-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
607-249-00-X	diacrylate de (1-méthyl-1,2-éthane-diy)bis(oxy(méthyl-2,1-éthane-diy))		256-032-2	42978-66-5	Xi: R36/37/38 R43 N: R51-53	Xi: N R: 36/37/38-43-51/53 S: (2)-24-37-61	C ≥ 10%: Xi; R36/37/38-43 1% ≤ C < 10%: Xi; R43	
607-252-00-6	lambda-cyhalothrine (ISO) isomères (S)(Z)-(1R, 3R) et (R)(Z)-(1S, 3S) de 3-(2-Chloro-3,3,3-trifluoropropényl)-2,2-diméthylcyclopropanecarboxylate de a-cyano-3-phénoxybenzyle		415-130-7	91465-08-6	T+; R26 T; R25 Xn; R21 N: R50-53	T+; N R: 21-25-26-50/53 S: (1/2)-28-36/37/39-38-45-60-61		
607-255-00-2	fluroxypyr (ISO) acide 4-amino-3,5-dichloro-6-fluoro-2-pyridyloxyacétique		—	69377-81-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
608-003-00-4	acrylonitrile	D E	203-466-5	107-13-1	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38-41 R43 N: R51-53	F; T; N R: 45-11-23-/24/25-37/38-41-43-51/53 S: 9-16-53-45-61	C ≥ 20%: T; R45-23/24/25-37/38-41-43 10% ≤ C < 20%: T; R45-23/24/25-41-43 5% ≤ C < 10%: T; R45-23/24/25-36-43 1% ≤ C < 5%: T; R45-23/24/25-43 0,2% ≤ C < 1%: T; R45-20/21/22 0,1% ≤ C < 0,2%: T; R45	
608-016-00-5	1,4-dicyano-2,3,5,6-tétrachlorobenzène		401-550-8	1897-41-2	R43 N: R50-53	Xi: N R: 43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
609-030-00-4	dinoterbe (ISO) 2-tert-butyl-4,6-dinitrophénol	E	215-813-8	1420-07-1	Repr. Cat. 2; R61 T+; R28 T; R24 R44 N: R50-53	T+; N R: 61-24-28-44-50/53 S: 53-45-60-61		
609-040-00-9	nitrofène (ISO) oxyde de 2,4-dichlorophényle et de 4-nitrophényle	E	217-406-0	1836-75-5	Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat. 2; R61 Xn; R22 N: R50-53	T; N R: 45-61-22-50/53 S: 53-45-60-61		
609-044-00-0	tecnazène (ISO) 1,2,4,5-tétrachloro-3-nitrobenzène		204-178-2	117-18-0	Xn; R22 R43 N: R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
611-008-00-4	4-aminoazobenzène		200-453-6	60-09-3	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
611-013-00-1	1-hydroxy-7-(3-sulfonatoanilino)-2-(3-méthyl-4-(2-méthoxy-4-(3-sulfonatophénylazo)phénylazo)naphthalène-3-sulfonate de trilitium		403-650-7	117409-78-6	E; R2 N; R51-53	E; N R: 2-51/53 S: (2-)35-61		
611-031-00-X	chlorhydrate de 4,4'-(4-iminocyclohexa-2,5-diénylidène)éthylène)dianiline C.I. Basic Red 9		209-321-2	569-61-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-035-00-4	2-méthoxyaniline o-anisidine	E	201-963-1	90-04-0	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25 S: 53-45		
612-042-00-2	benzidine 4,4'-diaminobiphényle	E	202-199-1	92-87-5	Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25%; T; R45-22 0,01% ≤ C < 25%; T; R45	
612-051-00-1	4,4'-diaminodiphénylméthane 4,4'-méthylènedianiline	E	202-974-4	101-77-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R39/23/24/25Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53	T; N R: 45-39/23/24/25-43-48/20/ 21/22-51/53 S: 53-45-61		
612-081-00-5	sels de 4,4'-bi-o-taluidine sels de o-tolidine sels de 3,3'-diméthylbenzidine	A E	210-322-5 265-294-7 277-985-0	612-82-8 64969-36-4 74753-18-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		
612-099-00-3	4-méthyl-m-phénylènediamine toluène-2,4-diamine	E	202-453-1	95-80-7	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
612-105-00-4	2-pipérazine-1-yléthylamine		205-411-0	140-31-8	Xn, R21/22 C; R34 R43 R52-53	C R: 21/22-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
612-111-00-7	2-méthyl- <i>m</i> -phénylènediamine toluène-2,6-diamine		212-513-9	823-40-5	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-40-43-51/53 S: (2-24-36/37-61		
612-125-00-3	2-méthyl- <i>p</i> -phénylènediamine toluène-2,5-diamine		202-442-1	95-70-5	T; R25 Xn; R20/21 R43 N; R51-53	T; N R: 20/21-25-43-51/53 S: (1/2-24-37-45-61		
612-144-00-7	flumétraline (ISO) N-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-N-éthyl- <i>a,a</i> -tri-fluoro-2,6-dinitro- <i>p</i> -toluidine		—	62924-70-3	Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-43-50/53 S: (2-36/37-60-61		
612-151-00-5	diaminotoluène	E	246-910-3	25376-45-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-20/21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
613-018-00-4	morfamquat (ISO) 1,1'-bis(3,5-diméthylmorpholinocarbonyl-méthyl)-4,4'-bipyridiliumion		—	7411-47-4	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn R: 22-36/37/38-52/53 S: (2-22-36-61		
613-031-00-5	symclosène trichloro-1,3,5-triazine-2,4,6-trione acide trichloroisocyanurique		201-782-8	87-90-1	O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50-53	O; Xn; N R: 8-22-31-36/37-50/53 S: (2-8-26-41-60-61		
613-038-00-3	6-phényl-1,3,5-triazine-2,4-diyldiamine benzoguanamine		202-095-6	91-76-9	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-61		
613-042-00-5	imazalil (ISO) 1-[2-(allyloxy)-2-(2,4-dichlorophényl)éthyl]-1H-imidazole		252-615-0	35554-44-0	Xn; R20/22 N; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-26-39-60-61		
613-043-00-0	imazalil sulfate (ISO) hydrogénosulfate de 1-[2-(allyloxyéthyl)-2-(2,4-dichlorophényl)-1H-imidazolium [1] hydrogénosulfate de (±)-1-[2-(allyloxyéthyl)-2-(2,4-dichlorophényl)]-1H-imidazolium [2]		261-351-5 [1] 281-291-3 [2]	58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2]	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-26-39-60-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
613-066-00-6	terbuméon (ISO) N ² - <i>tert</i> -butyl-N'éthyl-6-méthoxy-1,3,5-triazine-2,4-diamine		251-637-8	33693-04-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
613-091-00-2	dichlorure de morfamquat [1] sulfate de morfamquat [2]		225-062-8 [1] 29873-36-7 [2]	4636-83-3 [1] 29873-36-7 [2]	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn; R: 22-36/37/38-52/53 S: (2)-22-36-61		
613-098-00-0	N-(n-octyl)-2-pyrrolidinone		403-700-8	2687-94-7	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2)-23-26-36/37/39-45-61		
613-130-00-3	hexazonazole (ISO) (RS)-2-(2,4-dichlorophényl)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-(γ))hexan-2-ol		—	79983-71-4	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
613-131-00-9	pyroquilone (ISO) 1,2,5,6-tétrahydropyrrolo[3,2,1-ij]quinolin-4-one		—	57369-32-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-61		
613-134-00-5	myclobutanil (ISO) 2- <i>p</i> -chlorophényl-2-(1H-1,2,4-triazole-1-ylméthyl)hexanenitrile		—	88671-89-0	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51-53	Xn; N R: 22-36-51/53-63 S: (2)-36/37-46-61		
613-137-00-1	méthabenzthiazuron (ISO) 1-(benzothiazol-2-yl)-2,3-diméthylurée		242-505-0	18691-97-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-139-00-2	mésulfuron méthyle benzoate de méthyle 2-(4-méthoxy-6-méthyl-1,3,5-triazin-2-ylcarbamoyle)sulfamoyl)		—	74223-64-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
614-001-00-4	nicotine (ISO)		200-193-3	54-11-5	T+; R27 T; R25 N; R51-53	T+; N R: 25-27-51/53 S: (1/2)-36/37-45-61		
614-006-00-1	brucine		206-614-7	357-57-3	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2)-13-45-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
614-007-00-7	sulfate de brucine [1] nitrate de brucine [2] 2,3-diméthoxystrychnidin-10-one, composé avec le benzène-1,2-dicarboxylate de (R)-mono-1-méthylheptyle [3] 2,3-diméthoxystrychnidin-10-one, composé avec le benzène-1,2-dicarboxylate de (S)-mono-1-méthylheptyle [4]		225-432-9 [1] 227-317-9 [2] 269-439-5 [3] 269-710-8 [4]	4845-99-2 [1] 5786-97-0 [2] 68239-26-9 [3] 68310-42-9 [4]	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2-)13-45-61		
615-006-00-4	diisocyanate de 2-méthyl-m-phénylène [1] diisocyanate de 4-méthyl-m-phénylène [2] diisocyanate de m-tolylidène [3] 2,6-diisocyanate de toluylène [1] 2,6-TDI [1] 2,4-diisocyanate de toluylène [2] 2,4-TDI [2] diisocyanate de toluylène [3] TDI [3]	C	202-039-0 [1] 209-544-5 [2] 247-722-4 [3]	91-08-7 [1] 584-84-9 [2] 26471-62-5 [3]	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52-53	T+ R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53 S: (1/2-)23-36/37-45-61	C ≥ 20%; T+; R26-36/37/38-40-42/43 7% ≤ C < 20%; T+; R26-40-42/43 1% ≤ C < 7%; T; R23-40-42/43 0,1% ≤ C < 1%; Xn; R20-42	2
616-010-00-9	chloramine T (sel de sodium) tosylchloramide sodique		204-854-7	127-65-1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22-31-34-42 S: (1/2-)7-22-26-36/37/39-45		
616-034-00-X	pyracarbolide (ISO)		246-419-4	24691-76-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-035-00-5	cymoxamil 2-cyano-N-[(éthylamino)carbonyl]-2-(méthoxyimino)acétamide		261-043-0	57966-95-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
617-004-00-9	hydroperoxyde de 1,2,3,4-tétrahydro-1-naphthyle		212-230-0	771-29-9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	O; C; N R: 7-22-34-50/53 S: (1/2-)3/7-14-26 -36/37/39-45-60-61	C ≥ 25%; C; R22-34 10% ≤ C < 25%; C; R34 5% ≤ C < 10%; Xi; R36/37/38	
617-006-00-X	peroxyde de bis(α,α-diméthylbenzyle)		201-279-3	80-43-3	O; R7 Xi; R36/38 N; R51-53	O; Xi; N R: 7-36/38-51/53 S: (2-)3/7-14-36/37/39-61		
617-008-00-0	peroxyde de dibenzoyl		202-327-6	94-36-0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi; R: 2-36-43 S: (2-)3/7-14-36/37/39		
650-007-00-3	chlordiméforme (ISO) N ² -(4-chloro-o-tolyl)-N ¹ ,N ¹ -diméthylformamide		228-200-5	6164-98-3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
650-008-00-9	drazoxolon (ISO) 4-(2-chlorophénylhydrazono)-3-méthyl-5-isoxazalone		227-197-8	5707-69-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-24-36/37-45-60-61		
650-009-00-4	chlorodiméforme, monochlorhydrate N'-(4-chloro- <i>o</i> -tolyl)-N,N'-diméthylformamide, monochlorhydrate		243-269-1	19750-95-9	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
650-033-00-5	esfenvalérate (ISO) (S)- <i>a</i> -cyano-3-phénoxybenzyl (S)-2-(4-chlorophényl)-3-méthylbutyrate		—	66230-04-4	T; R23/25 R43 N; R50-53	T; N R: 23/25-43-50/53 S: (1/2-)24-36/37/39-45-60-61		
650-041-00-9	triasulfuron (ISO) 3-(6-méthoxy-4-méthyl-1,3,5-triazin-2-yl)-1-[2-(2-chloréthoxy)-phényl-sulfonyl]-urée		—	82097-50-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

ANNEXE I D

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
006-090-00-8	Phénylcarbamate de 2-(3-iodoprop-2-yn-1-yloxy)éthyle		408-010-0	88558-41-2	Xn; R20 Xi; R41 R52-53	Xn R: 20-41-52/53 S: (2)-22-26-39-61		
014-016-00-0	Mélange de: 1,3-dihex-5-én-1-yl-1,1,3,3-tétraméthylsiloxane; 1,3-dihex-n-5-én-1-yl-1,1,3,3-tétraméthylsiloxane		406-490-6	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-164-00-9	P,P'-(1-hydroxyéthylène)bis(hydrogénophosphate) de calcium, dihydrate		400-480-5	36669-85-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		
015-165-00-4	Mélange de: bishexafluorophosphate de thio-bis(4,1-phénylène)-S,S',S',S'-tétraphényldisulfonium; hexafluorophosphate; de diphényl(4-phénylthiophényl)sulfonium		404-986-7	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2)-15-26-39-60-61		
015-166-00-X	3,9-bis(2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénoxy)-2,4,8,10-tétraoxa-3,9-diphosphaspiro[5,5]undécane		410-290-4	80693-00-1	R53	R: 53 S: 61		
015-167-00-5	acide 3-(hydroxyphénylphosphiny)propanoïque		411-200-6	14657-64-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
601-050-00-1	benzène, dérivés alkyles en C ₁₀ -C ₁₃		267-051-0	67774-74-7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601-051-00-7	4-phénylbut-1-ène		405-980-7	768-56-9	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2)-37-61		
602-083-00-4	oxyde de diphényle, dérivé pentabromé		251-084-2	32534-81-9	Xn; R48/21/22 R64 N; R50-53	Xn; N R: 48/21/22-50/53-64 S: (1/2-36/37-45-60-61		
602-084-00-X	1,1-dichloro-1-fluoroéthane		404-080-1	1717-00-6	N; R52-53-59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-128-00-0	2-(phénylméthoxy)naphthalène		405-490-3	613-62-7	R53	R: 53 S: 61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
603-129-00-6	1-tert-butoxypropan-2-ol		406-180-0	57018-52-7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2)-26-39		
603-130-00-1	Mélange d'isomères de: α -(diméthylbiphényl)- ω -hydroxypoly(oxyéthylène)		406-325-8	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-39-61		
603-131-00-7	Mélange (3:1) de: 1-désoxy-1-[méthyl-(1-oxododécyl)amino]-D-glucitol; 1-désoxy-1-[méthyl-(1-oxotétradécyl)amino]-D-glucitol		407-290-1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
603-132-00-2	2-hydroxyméthyl-9-méthyl-6-(1-méthylétyl)-1,4-dioxaspiro[4.5]décane		408-200-3	63187-91-7	Xi; R38-41 R52-53	Xi R: 38-41-52/53 S: (2)-26-37/39-61		
603-133-00-8	Mélange de: 3-[4-amino-2-chloro-5-nitrophényl]amino]propane-1,2-diol; 3'-(2-chloro-5-nitro-1,4-phénylèndiimino)bis(propane-1,2-diol)		408-240-1	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-22-36-61		
603-134-00-3	Mélange de dodécyle et/ou tétradécyle diphényle éthers substitués. La substance est produite par la réaction de Friedel Craft. Le catalyseur est retiré du produit de réaction. Le diphényléther est substitué par des groupes C1-C10 alkyle. Les groupes alkyle sont liés au hasard entre C1 et C6. Les chaînes linéaires C12 et C14 sont utilisées à parité (50/50).		410-450-3	—	R53	R: 53 S: 61		
603-135-00-9	bis[[2,2',2''-nitriлотris-[éthanolate]]-1-N,O]bis[2-(2-méthoxyéthoxy)éthoxy]-titane		410-500-4	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2)-26-39-61		
603-136-00-4	3-((4-bis(2-hydroxyéthyl)amino)-2-nitro-phényl)amino)-1-propanol		410-910-3	104226-19-9	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2)-24-37-61		
603-137-00-X	Mélange de: 1-désoxy-1-[méthyl-(1-oxohexadécyl)amino]-D-glucitol; 1-désoxy-1-[méthyl-(1-oxooctadécyl)amino]-D-glucitol		411-130-6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
603-138-00-5	3-(2,2-diméthyl-3-hydroxypropyl)toluène		403-140-4	103694-68-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
604-050-00-X	4-chloro-o-crésol 4-chloro-2-méthylphénol		216-381-3	1570-64-5	T; R23 C; R35 N; R50	T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2-)/26-36/37/39-45-61	C ≥ 25%: T; C; R23-35 10% ≤ C < 25%: C; R20-35 5% ≤ C < 10%: C; R20-34 3% ≤ C < 5%: Xn; R20-36/37/38 1% ≤ C < 3%: Xi; R36/37/38	
604-051-00-5	3,5-bis((3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy)benzyl)- 2,4,6-triméthylphénol		401-110-5	87113-78-8	R52-53	R: 52/53 S: 61		
604-052-00-0	2,2'-méthylènebis(6-(2H-benzotriazol- 2-yl)-4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phénol)		403-800-1	103597-45-1	R53	R: 53 S: 61		
604-053-00-6	2-méthyl-4-(1,1-diméthyléthyl)-6- (1-méthylpentadécyl)phénol		410-760-9	157661-93-3	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)/24-37-60-61		
604-054-00-1	Mélange de: 2-méthoxy-4-(tétrahydro-4-mé- thylène-2H-pyran-2-yl)phénol; 4-(3,6-dihy- dro-4-méthyl-2H-pyran-2-yl)-2-méthoxyphénol		412-020-0	—	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)/24-37-61		
604-055-00-7	2,2'-((3,5',5'-tétraméthyl-(1,1'-biphényl)- 4,4'-diyl)-bis(oxyéthylène))-bis-oxirane		413-900-7	85954-11-6	Muta.Cat.3; R40	Xn R: 40 S: (2-)/22-36-37		
605-027-00-7	Mélange de: 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-4,7- méthano-1H-indène-6-carboxaldéhyde; 3a,4,5,6,7,7a-hexahydro-4,7-méthano-1H- indène-5-carboxaldéhyde		410-480-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)/24-37-61		
606-051-00-0	4-pentylcyclohexanone		406-670-4	61203-83-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-052-00-6	4-(N,N-dibutylamino)-2-hydroxy-2'- carboxybenzophénone		410-410-5	54574-82-2	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-272-00-5	fluoroxypyrr-méptyl (ISO) [1] fluoroxypyrr-butometyl (ISO) [2] [(4-amino-3,5-dichloro-6-fluoro-2-pyri- dyloxy)acétate de 1-méthylheptyle [1] [(4-amino-3,5-dichloro-6-fluoro-2-pyri- dyloxy)acétate de 2-butoxy-1-méthyléthyle [2] ester de 1-méthylheptyle du fluoroxypr [1] ester de butoxypropyle du fluoroxypr [2]	279-752-9 [1] — 81406-37-3 [1] 154486-27-8 [2]	410-410-5	54574-82-2	R52-53	R: 52/53 S: 61		N R: 50/53 S: 60-61

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
607-273-00-0	7-(2,6-diméthyl-8-(2,2-diméthylbutyryloxy)-1,2,6,7,8,8a-hexahydro-1-naphthyl)-3,5-dihydroxyheptanoate d'ammonium		404-520-2	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-274-00-6	3-amino-2-buténoate de 2-(N-benzyl-N-méthylamino)éthyle		405-350-1	54527-73-0	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-275-00-1	benzoyloxybenzène-4-sulfonate de sodium		405-450-5	66531-87-1	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
607-276-00-7	complexe de zinc de bis[(1-méthylimidazol)-(2-éthyl)-hexanoate]]		405-635-0	—	Xi: R38-41 N: R50-53	Xi: N R: 38-41-50/53 S: (2)-26-37/39-60-61		
607-277-00-2	Mélange de: 2-(hexylthio)éthylamine, chlorhydrate; propionate de sodium		405-720-2	—	Xn: R22 Xi: R41 R43 N: R51-53	Xn: N R: 22-41-43-51/53 S: (2)-24-26-37/39-61		
607-278-00-8	Mélange d'isomères de: phénéthyl-naphthalènesulfonate de sodium; naphthyléthylbenzènesulfonate de sodium		405-760-0	—	Xi: R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2)-24-26-37/39-61		
607-279-00-3	Mélange de: bis(hydrogénomaléate) de n-octadécylaminodiéthyle; hydrogénomaléate-hydrogénomaléate de n-octadécylaminodiéthyle		405-960-8	—	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-280-00-9	4-chloro-1-hydroxybutane-1-sulfonate de sodium		406-190-5	54322-20-2	Xn: R22 Xi: R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2)-22-26-36/37		
607-281-00-4	Mélange de 3-[3-(2H-benzotriazol-2-yl)-5-(1,1-diméthyléthyl)-4-hydroxypényl]propionates de C7-C9 alkyle ramifié et linéaire		407-000-3	127519-17-9	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-282-00-X	acétate de 2-acétoxyéthyl-4-benzoyloxy-but-1-yle		407-140-5	131266-10-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
607-283-00-5	4-oxo-4-phénylcrotonate d'éthyle; (alt): (E)-4-oxo-4-phénylbut-2-énoate d'éthyle		408-040-4	15121-89-8	Xn; R21/22 Xi; R38-41 R43 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-38-41-43-50/53 S: (2)-26-36/37/39-60-61		
607-284-00-0	Mélange (9:1) de: 3,3'-(1,4-phénylènebis(carbo-nylimino-3,1-propanediylimino))bis(10-amino-6,1,3-dichloro)-4,1,1-triphénodioxazinedisulfonate de sodium; 3,3'-(1,4-phénylènebis(carbo-nylimino-3,1-propanediylimino))bis(10-amino-6,1,3-dichloro)-4,1-triphénodioxazinedisulfonate de lithium		410-040-4	136213-76-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-285-00-6	Mélange de: acide 7-(((3-aminophényl)sulfonylamino)-naphthène-1,3-disulfonique; 7-(((3-aminophényl)sulfonylamino)naphatène-1,3-disulfonate de sodium; 7-(((3-aminophényl)sulfonylamino)naphalène-1,3-disulfonate de potassium		410-065-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
607-286-00-1	Mélange de: 7-[[[3-[[4-(2-hydroxy-naphtyl)azo]-phényl]azo]phényl]sulfonyl]amino]naphthalène-1,3-disulfonate de sodium et de potassium		410-070-8	141880-36-6	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2)-22-24-37-61		
607-287-00-7	O-(1-méthyl-2-méthacryloyloxy-éthyl)-1,2,3,6-tétrahydrophthalate de O'-méthyle		410-140-8	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-288-00-2	(c-(3-(1-(3-(6-dichloro-5-cyanopyrimidin-5-yl(méthyl)amino)propyl)-1,6-dihydro-2-hydroxy-4-méthyl-6-oxo-3-pyridyl)azo)-4-sulfonatotophénylsulfamoyl)phthalocyanine-a,b,d-trisulfonate(6-))nickelate II de tétrasodium, où a est 1 ou 2 ou 3 ou 4, b est 8 ou 9 ou 10 ou 11, c est 15 ou 16 ou 17 ou 18, d est 22 ou 23 ou 24 ou 25 et où e et f ensemble sont 2 et 4 ou 4 et 2 respectivement		410-160-7	148732-74-5	Xi; R36 R43 R52-53	Xi R: 36-43-52/53 S: (2)-22-26-36/37-61		
607-289-00-8	acide 3-(3-(4-(2,4-bis(1,1-diméthylpropyl)phénoxy)butyl)aminocarbonyl-4-hydroxy-1-naph-talényl)thio)propanoïque		410-370-9	105488-33-3	R53	R: 53 S: 61		
607-290-00-3	Mélange (le ratio n'est pas connu) de: 1-C14-C18-alkyloxy-carbonyl-2-(3-allyloxy-2-hydroxypropoxy-carbonyl)éthane-1-sulfonate d'ammonium; 2-C14-C18-alkyloxy-carbonyl-1-(3-allyloxy-2-hydroxypropoxy-carbonyl)éthane-1-sulfonate d'ammonium		410-540-2	—	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
607-291-00-9	ω -(C5(C6-cycloalkyl)alkyl)carboxylate de dodécyle		410-630-1	104051-92-5	R53	R: 53 S: 61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
607-292-00-4	Mélange de: acide [1-(méthoxyméthyl)-2-(C12-alkoxy)-éthoxy]acétique; acide [1-(méthoxyméthyl)-2-(C14-alkoxy)-éthoxy]acétique		410-640-6	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2)-26-37/39-60-61		
607-293-00-X	Mélange de: éther mono2,4,6-triméthylonyldi-phénylique de di-sulfonate de N-aminoéthylpipérazonium; éther di-2,4,6-triméthylonyldi-phénylique de di-sulfonate de N-amino-éthylpipérazonium		410-650-0	—	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2)-26-36/37/39-61		
607-294-00-5	2-benzoyloxy-1-hydroxyéthane-sulfonate de sodium		410-680-4	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
607-295-00-0	Mélange de: phosphonéthane-1,2-dicarboxylate de tétrasodium; phosphonobutane-1,2,3,4-tétracarboxylate d'hexasodium		410-800-5	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-296-00-6	Mélange de: tétraesters de pentaérythriol avec acide heptanoïque et acide 2-éthylhexanoïque		410-830-9	—	R53	R: 53 S: 61		
607-297-00-1	acide (E)-3,3'-(1,4-phénylène)diméthylidène)bis(2-oxobornane-10-sulfonique)		410-960-6	92761-26-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
607-298-00-7	2-(triméthylammonium)éthoxycarboxybenzène-4-sulfonate		411-010-3	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-36/37		
607-299-00-2	3-(acétylthio)-2-méthyl-propanoate de méthyle		411-040-7	97101-46-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
607-300-00-6	[2-(5-chloro-2,6-difluoropyrimidin-4-ylamino)-5-(β-sulfamoyl-c,d-sulfonatophthalocyanin-α-yl)-K4,N29,N30,N31,N32-sulfonylamino]benzoato(5-)]cuprate(II) de trisodium où a = 1, 2, 3 ou 4 b = 8, 9, 10 ou 11; c = 1, 5, 16, 17 ou 18; d = 22, 23, 24 ou 25		411-430-7	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
607-301-00-1	Mélange de: acide dodécanoïque; esters de poly(1-7)lactate de l'acide dodécanoïque		411-860-5	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2)-24-26-37/39-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
607-302-00-7	Mélange de: acide tétradécanoïque; esters de poly(1-7)lactate de l'acide tétradécanoïque		411-910-6	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-303-00-2	acide 1-cyclopropyl-6,7-difluoro-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylique		413-760-7	93107-30-3	Repr. Cat.3; R62 R52-53	Xn R: 62-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
608-023-00-3	4-(4-chlorophényl)-2-phényl-2-[(1H-1,2,4-triazol-1-yl)méthyl]butanenitrile		406-140-2	114369-43-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-024-00-9	2-(4-(N-butyl-N-phénéthylamino)phényl)éthylène-1,1,2-tricarbonitrile		407-650-8	97460-76-9	R53	R: 53 S: 61		
608-025-00-4	2-nitro-4,5-bis(benzyloxy)phénylacétonitrile		410-970-0	117568-27-1	R53	R: 53 S: 61		
609-053-00-X	hydrazine-tri-nitrométhane		414-850-9	—	E; R3 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 R43	E; T R: 45-3-8-23/25-43 S: 53-45		
610-010-00-2	2-bromo-1-(2-furyl)-2-nitroéthylène		406-110-9	35950-52-8	Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61		
611-043-00-5	Mélange (2:1:1) de: N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')- η -6-[2-amino-4-(ou 6)-hydroxy-(ou 4-amino-2-hydroxy)phénylazo]-6'-(1-carbaniloyl-2-hydroxyprop-1-énylazo)-5',5''-disulfamoyl-3,3''-disulfonabis(naphtalène-2,1'-azobenzène-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-chromate de trisodium; N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')- η -6,6''-bis(1-carbaniloyl-2-hydroxyprop-1-énylazo)-5',5''-disulfamoyl-3,3''-disulfonabis(naphtalène-2,1'-azobenzène-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-chromate; de trisodium; 1,2'-diolato-O(1),O(2'))-chromate; de trisodium; N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')- η -6,6''-bis[2-amino-4-(ou 6)-hydroxy-(ou 4-amino-2-hydroxy)phénylazo]5',5''-disulfamoyl-3,3''-disulfonabis(naphtalène-2,1'-azobenzène-1,2'-diolato-O(1),O(2'))-chromate de trisodium		402-850-1		Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
611-044-00-0	Mélange de: bis[1-(2-hydroxy-5-nitrophényl)azo]-2-naphthaléno(2-)-chromate(1-) de tert-alkyl(C12-C14)ammonium; bis[1-(2-hydroxy-4-nitrophényl)azo]-2-naphthaléno(2-)-chromate(1-) de tert-alkyl(C12-C14)ammonium; bis[1-(5-(1,1-diméthylpropyl)-2-hydroxy-3-nitrophényl)azo]-2-naphthaléno(2-)-chromate(1-) de tert-alkyl(C12-C14)ammonium; [[1-(2-hydroxy-5-nitrophényl)azo]-2-naphthaléno(2-)-[1-(2-hydroxy-5-nitrophényl)azo]-2-naphthaléno(2-)]-chromate(1-)de tert-alkyl(C12-C14)ammonium; [[1-(5-(1,1-diméthylpropyl)-2-hydroxy-3-nitrophényl)azo]-2-naphthaléno(2-)-[1-(2-hydroxy-5-nitrophényl)azo]-2-naphthaléno(2-)]-chromate(1-) de tert-alkyl(C12-C14)ammonium; ((1-(4(ou 5)-nitro-2-oxidophénylazo)-2-naphitolato)(1-(3-nitro-2-oxido-5-pentylphénylazo)-2-naphitolato))chromate(1-) de C12-C14-tert-alkylammonium		403-720-7	117527-94-3	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-045-00-6	2-[4-[N-(4-acétoxybutyl)-N-éthyl]amino-2-méthylphénylazo]-3-acétyl-5-nitrothiophène		404-830-8	—	R53	R: 53 S: 61		
611-046-00-1	4,4'-diamino-2-méthylazobenzène		407-590-2	43151-99-1	T; R25 Xn; R48/22 R43 N; R50-53	T; N R: 25-43-48/22-50/53 S: (1/2)-22-28-36/37-45-60-61		
611-047-00-7	Mélange (1:1) de: 2-[[4-[N-éthyl-N-(2-acétoxyéthyl)amino]phénylazo]-5,6-dichlorobenzothiazole]; 2-[[4-[N-éthyl-N-(2-acétoxyéthyl)amino]phénylazo]-6,7-dichlorobenzothiazole]		407-890-3	111381-11-4	R53	R: 53 S: 61		
611-048-00-2	Mélange (1:1) de: 2-[[4-bis(2-acétoxyéthyl)amino]phénylazo]-5,6-dichlorobenzothiazole; 2-[[4-bis(2-acétoxyéthyl)amino]phénylazo]-6,7-dichlorobenzothiazole]		407-900-6	111381-12-5	R53	R: 53 S: 61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
611-049-00-8	7-[4-(3-diéthylaminopropylamino)-6-(3-diéthylammoniopropylamino)-1,3,5-triazin-2-ylamino]-4-hydroxy-3-(4-phénylazophénylazo)naphthalène-2-sulfonate, acide acétique, acide lactique (2:1:1)		408-000-6	118658-98-3	Xn; R48/22 R43 R52-53	Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2)-(22-36)/37-61		
611-051-00-9	chlorure de 2-(4-(N-éthyl-N-(2-hydroxyéthyl)amino-2-méthylphényl)azo-6-méthoxy-3-méthyl-benzothiazolium		411-110-7	136213-74-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-052-00-4	complexe de fer de aqua-[5-[[2,4-dihydroxy-5-[(2-hydroxy-3,5-dinitrophényl)azo]phénylazo]-2-naphthalènesulfonate] de monosodium		400-720-9	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
612-156-00-2	Mélange de: chlorure de trihexadécylméthylammonium; chlorure de dihexadécylméthylammonium		405-620-9	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2)-26-39-60-61		
612-157-00-8	(Z)-1-benzo[b]thièn-2-yléthanone oxime chlorhydrate		410-780-8	—	Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-48/22-51/53 S: (2)-22-26-36/37/39-61		
612-158-00-3	Mélange de: bis(5-dodécyl-2-hydroxybenzaldoximate) de cuivre (II). Le groupe alkyl C12 est ramifié; 4-dodécylsalcylaldoxime		410-820-4	—	R53	R: 53 S: 61		
612-159-00-9	Produits de réaction de: triméthylhexaméthylène diamine (un mélange de 2,2,4-triméthyl-1,6-hexanediamine et 2,4,4-triméthyl-1,6-hexanediamine, listé dans Einecs), epoxide 8 (dérivé de mono[(C10-C16-alkyloxy)méthyl]oxirane) et acide p-toluène-sulfonique		410-880-1	—	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2)-23-26-36/37/39-45-60-61		
613-149-00-7	2-tert-butyl-5-(4-tert-butylbenzylthio)-4-chloropyridazine-3(2H)-one		405-700-3	96489-71-3	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2)-36/37-45-60-61		
613-150-00-2	2,2'-[3,3'-(pipérazine-1,4-diyldipropyl)bis(1H-benzimidazo[2,1-b]benzo[1,4-m,n][3,8]phénanthroline-1,3,6-trione		406-295-6	—	R53	R: 53 S: 61		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
613-151-00-8	1-(3-mésyloxy-5-trityloxy-2-D-thréofuryl)thymine		406-360-9	104218-44-2	R53	R: 53 S: 61		
613-152-00-3	N-(4,6-diméthoxypyrimidin-2-yl)carbamate de phényle		406-600-2	89392-03-0	R43 N: R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
613-153-00-9	2,3,5-trichloropyridine		407-270-2	16063-70-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		
613-154-00-4	2-amino-4-chloro-6-méthoxypyrimidine		410-050-9	5734-65-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)-22		
613-155-00-X	5-chloro-2,3-difluoropyridine		410-090-7	89402-43-7	R10 Xn; R22 R52-53	Xn R: 10-22-52/53 S: (2)-23-36-61		
613-156-00-5	2-butyl-4-chloro-5-formylimidazole		410-260-0	83857-96-9	R43 N: R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
613-157-00-0	2,4-diamino-5-méthoxyméthylpyrimidine		410-330-0	54236-98-5	Xn; R22-48/22 Xi; R36	Xn R: 22-36-48/22 S: (2)-22-26-36		
613-158-00-6	2,3-dichloro-5-trifluorométhyl-pyridine		410-340-5	69045-84-7	Xn; R20/22 Xi; R41 R43 N: R51-53	Xn; N R: 20/22-41-43-51/53 S: (2)-24-26-37/39-61		
613-159-00-1	4-[2-[4-(1,1-diméthyléthyl)phényl]-éthoxy]quinazoline		410-580-0	120928-09-8	T; R25 Xn; R20 N: R50-53	T; N R: 20-25-50/53 S: (1/2)-37-45-60-61		
613-160-00-7	(1S)-2-méthyl-2,5-diazobicyclo[2.2.1]heptane dibromohydrate		411-000-9	125224-62-6	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
615-022-00-1	3-isocyanatosulfonyl-2-thiophène-carboxylate de méthyle		410-550-7	79277-18-2	E; R2 R14 Xn; R48/22 R42/43	E; Xn R: 2-14-42/43-48/22 S: (2)-22-30-35-36/37		

Numéro d'index	Nom chimique	Notes relatives aux substances	Numéro CE	Numéro CAS	Classification	Étiquetage	Limites de concentration	Notes relatives aux préparations
615-023-00-7	2-(isocyanatosulfonyleméthyl)benzoate de méthyle		410-900-9	83056-32-0	R10 R14 Muta. Cat.3; R40 Xn; R20-48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10-14-20-40-41-42-48/22 S: (2)-23-26-36/37/39		
616-044-00-4	N-(3,5-dichloro-4-éthyl-2-hydroxyphényl)-2-(3-pentadécylphénoxy)-butanamide		402-510-2	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-045-00-X	2'-(4-chloro-3-cyano-5-formyl-2-thiénylazo)-5'-diéthylamino-2-méthoxyacétanilide		405-190-2	122371-93-1	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2)-22-24-37-61		
616-046-00-5	N-(2-(6-chloro-7-méthylpyrazolo(1,5-b)-1,2,4-triazol-4-yl)propyl)-2-(2,4-di-tert-pentylphénoxy)octanamide		406-390-2	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-047-00-0	Mélange de: 2,2',2'',2''',2''''-(éthylènedinitrilotétrakis-N,N-di(C16)alkylacétamide; 2,2',2'',2''',2''''-(éthylènedinitrilotétrakis-N,N-di(C18)alkylacétamide)		406-640-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
616-048-00-6	3'-trifluorométhylisobutyranilide		406-740-4	1939-27-1	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2)-22-36-61		
616-049-00-1	2-(2,4-bis(1,1-diméthylthyl)phénoxy)-N-(3,5-dichloro-4-éthyl-2-hydroxyphényl)-hexanamide		408-150-2	99141-89-6	R53	R: 53 S: 61		
616-050-00-7	N-[2,5-dichloro-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluoropropoxy)-phényl-aminocarbonyl]-2,6-difluorobenzamide		410-690-9	103055-07-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
616-051-00-2	Mélange de: 2,4-bis(N'-(4-méthylphényl)-uréido)-toluène; 2,6-bis(N'-(4-méthylphényl)-uréido)-toluène		411-070-0	—	R53	R: 53 S: 61		
617-015-00-9	Péroxyde de bis(4-méthylbenzoyl)		407-950-9	895-85-2	E; R2 O; R7 N; R50-53	E; N R: 2-7-50/53 S: (2)-7-14-36/37/39-47-60-61		
650-032-00-X	cyproconazole (ISO) (2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-chlorophényl)-3-cyclopropyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol		—	94361-06-5	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53-63 S: (2)-36/37-60-61		

ANNEXE 2

R 66

IT: L'esposizione ripetuta può provocare secchezza e screpolature della pelle.

(Ne concerne pas la version ES)

(Ne concerne pas la version DA)

(Ne concerne pas la version DE)

(Ne concerne pas la version EL)

(Ne concerne pas la version EN)

(Ne concerne pas la version FR)

(Ne concerne pas la version NL)

(Ne concerne pas la version PT)

(Ne concerne pas la version FI)

(Ne concerne pas la version SV)

ANNEXE 3 A

S 23

FR: Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant].

(Ne concerne pas la version ES)

(Ne concerne pas la version DA)

(Ne concerne pas la version DE)

(Ne concerne pas la version EL)

(Ne concerne pas la version EN)

(Ne concerne pas la version IT)

(Ne concerne pas la version NL)

(Ne concerne pas la version PT)

(Ne concerne pas la version FI)

(Ne concerne pas la version SV)

S 26

DE: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

(Ne concerne pas la version ES)

(Ne concerne pas la version DA)

(Ne concerne pas la version EL)

(Ne concerne pas la version EN)

(Ne concerne pas la version FR)

(Ne concerne pas la version IT)

(Ne concerne pas la version NL)

(Ne concerne pas la version PT)

(Ne concerne pas la version FI)

(Ne concerne pas la version SV)

S 56

DE: Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

EN: Dispose of this material and its container to hazardous or special waste collection point.

IT: Smaltire questo materiale e i relativi contenitori in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali.

(Ne concerne pas la version ES)

(Ne concerne pas la version DA)

(Ne concerne pas la version EL)

(Ne concerne pas la version FR)

(Ne concerne pas la version NL)

(Ne concerne pas la version PT)

(Ne concerne pas la version FI)

(Ne concerne pas la version SV)

—

ANNEXE 3B

S 27/28

DE: Bei Berührung mit der Haut beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen und Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben).

(Ne concerne pas la version ES)

(Ne concerne pas la version DA)

(Ne concerne pas la version EL)

(Ne concerne pas la version EN)

(Ne concerne pas la version FR)

(Ne concerne pas la version IT)

(Ne concerne pas la version NL)

(Ne concerne pas la version PT)

(Ne concerne pas la version FI)

(Ne concerne pas la version SV)

S 29/56

ES: No tirar los residuos por el desagüe; elimínese esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.

DE: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

EN: Do not empty into drains, dispose of this material and its container to hazardous or special waste collection point.

IT: Non gettare i residui nelle fognature; smaltire questo materiale e i relativi contenitori in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali.

NL: Afval niet in de gootsteen werpen; deze stof en de verpakking naar een inzamelpunt voor gevaarlijk of bijzonder afval brengen.

SV: Töm ej i avloppet, lämna detta material och dess behållare till insamlingsställe för farligt avfall.

(Ne concerne pas la version DA)

(Ne concerne pas la version EL)

(Ne concerne pas la version FR)

(Ne concerne pas la version PT)

(Ne concerne pas la version FI)

—

ANNEXE 4 A

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

1. MÉTHODE

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 chimie 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 vitro* 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'osmolarité, 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. DÉFINITIONS

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.

Polyploïde: 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 MÉTHODE 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 clochicine ou du Colcemid®), récoltées et teintes. Les cellules en métaphase sont soumises à un examen microscopique afin de déceler les aberrations chromosomiques.

1.4. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE 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 CO_2 , 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 cyostatiques. Cependant, l'index mitotique est une mesure acceptable pour des cultures en suspension pour lesquelles d'autres mesures de toxicité peuvent être incommodes 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 μ l/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'oeil 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 Einesc
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
	Éthylnitrosourée	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 cyclophosphamidée	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 simulation 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 minime (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 polyploïdie et d'endoreduplication.

2. RÉSULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

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. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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., Rimpou, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatid 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*, J. 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., Berid, 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 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.»

ANNEXE 4 B

«B.11. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI *IN VIVO* D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE SUR MOELLE OSSEUSE DE MAMMIFÈRE**1. MÉTHODE**

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 chimiquè 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. DÉFINITIONS

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 MÉTHODE 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 MÉTHODE 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 Eines
Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
Éthylnitrosourée	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	
Triéthylènemélamine	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 OPÉRATOIRE

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 évalués 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/100g 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. RÉSULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

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. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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.»
-

ANNEXE 4 C

«B.12. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI *IN VIVO* DU MICRONOYAU SUR ÉRYTHROCYTES DE MAMMIFÈRE

1. MÉTHODE

Cette méthode est une adaptation de la ligne directrice OCED 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. DÉFINITIONS

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.

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

Érythrocyte 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 MÉTHODE 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 MÉTHODE 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 Einesc
Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
N-éthyl N-nitrosourée	759-73-9	212-072-2
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	
Triéthylènemélamine	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 OPÉRATOIRE

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'organe 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 codés 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. **RÉSULTATS**

2.1. **TRAITEMENT DES RÉSULTATS**

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. **ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

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 systématique) 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 ± 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.»

ANNEXE 4 D

«B.13/14. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI DE MUTATION RÉVERSE SUR BACTÉRIES

1. MÉTHODE

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. DÉFINITIONS

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. CONSIDÉRATIONS PRÉLIMINAIRES

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 répartition 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 concérigènes 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 MÉTHODE 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 pyrolyzidiniques, 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 MÉTHODE 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 indicateurs 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 µl par boîte. Pour les substances d'essai non cytotoxiques qui sont insolubles à 5 mg ou 5 µl 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 µl/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 µl/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 EINECS
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	50-18-0	200-015-4
Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	

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

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

L' amino-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 Einescs	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. RÉSULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

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. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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 *Salomonella 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.»

ANNEXE 4 E

«B.17. MUTAGÉNICITÉ — ESSAI *IN VITRO* DE MUTATION GÉNÉRIQUE SUR CELLULES DE MAMMIFÈRE

1. MÉTHODE

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 mutagénicité 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 cancérogénicité. 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. DÉFINITIONS

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 MÉTHODE 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 MÉTHODE 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 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 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 μ 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° Einecs
Absence d'activation métabolique exogène	HPRT	Méthanesulfonate d'éthyle	62-50-0	200-536-7
		Éthylnitrosourée	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
	Éthylnitrosourée		759-73-9	212-072-2
	Présence d'activation métabolique exogène	HPRT	Méthyl-3 cholanthrène	56-49-5
N-Nitrosodiméthylamine			62-75-9	200-549-8
Diméthyl-7,12 benzanthrène			57-97-6	200-359-5
TK (petites et grandes colonies)		Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
		Monohydrate de cyclophosphamide	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° Einecs 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. RÉSULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

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. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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 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) 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.»

ANNEXE 4 F

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

1. MÉTHODE

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 diacnèse-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. DÉFINITIONS

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 MÉTHODE 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 MÉTHODE 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 spermatozoïdes 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° Eines
Cyclophosphamide	50-18-0	200-015-4
Monohydrate de cyclophosphamide	6055-19-2	
Cyclohexylamine	108-91-8	203-629-0
Mitomycine C	50-07-7	200-008-6
Acrylamide monomère	79-06-1	201-173-7
Triéthylèneméline	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 OPÉRATOIRE

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 évalués 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. RÉSULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

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. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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.»
-

ANNEXE 4 G

«B.39. ESSAI IN VIVO DE SYNTHÈSE NON PROGRAMMÉE DE L'ADN (UDS) SUR CELLULES HÉPATIQUES DE MAMMIFÈRE**1. MÉTHODE**

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 réplication 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. DÉFINITIONS

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 MÉTHODE 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 MÉTHODE

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° Einescs
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 OPÉRATOIRE

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. RÉSULTATS

2.1. TRAITEMENT DES RÉSULTATS

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. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

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.»

ANNEXE 5

SV:

3.2.3. *Nocif*

R65 Farligt: kan ge lungskador vid förtäring.

Flytande ämnen och beredningar som på grund av sin låga viskositet utgör en fara för människa vid aspiration

- a) För ämnen och beredningar som innehåller alifatiska, alicykliska och aromatiska kolväten i en total koncentration av 10 % eller mer och
- har en flödestid mindre än 30 sekunder, uppmätt med en 3 mm utloppsbägare enligt ISO 2431, eller
 - har en kinematisk viskositet lägre än 7×10^{-6} m²/s vid 40 °C, uppmätt med en kalibrerad kapillärviskosimeter av glas, enligt ISO 3104 och ISO 3105, eller
 - har en kinematisk viskositet lägre än 7×10^{-6} m²/s vid 40 °C, bestämd från rotationsviskosimetri enligt ISO 3219.

Ämnen och beredningar, som uppfyller dessa kriterier, behöver dock inte klassificeras om de har en genomsnittlig ytspänning högre än 33 mN/m vid 25 °C, uppmätt med en Noüy tensiometer eller enligt de testmetoder som finns beskrivna i bilaga V del A.5.

- b) För ämnen och beredningar, baserat på praktiska erfarenheter från människa.

(Ne concerne pas la version ES)

(Ne concerne pas la version DA)

(Ne concerne pas la version DE)

(Ne concerne pas la version EL)

(Ne concerne pas la version EN)

(Ne concerne pas la version FR)

(Ne concerne pas la version IT)

(Ne concerne pas la version NL)

(Ne concerne pas la version PT)

(Ne concerne pas la version FI)

FI:

3.2.6.1 *Ihon tulehtuminen*

Seuraava vaaraa osoittava lauseka määräytyy alla esiteltävien perusteitten mukaan:

R38 Ärsyttää ihoa

- Aineet ja valmisteet aiheuttavat ihon merkittävän tulehtumisen enintään neljän tunnin altistuksessa määritettynä kanilla liitteessä V mainitulla ihoärsyttestillä. Tulehdus kestää vähintään 24 tuntia.

Ihon tulehdus on merkittävää, jos:

- a) punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo laskettuna kaikista koe-eläimistä on vähintään 2;
- b) tai kun liitteessä V tarkoitettua testiä on täydennetty käyttämällä kolmea koe-eläintä, vähintään kahden koe-eläimen ihon punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo on, jokaiselle koe-eläimelle laskettuna erikseen, vähintään 2.

Kummassakin tapauksessa keskiarvojen lasekmiseen on käytettävä kaikkia niitä lukuarvoja, jotka saadaan arvioitaessa vaikutusta 24 tunnin, 48 tunnin ja 72 tunnin välein.

Tulehdusta pidetään myös merkittävänä, jos ihon tulehtuminen jatkuu ainakin kahdella koe-elämellä havainnointiajan päättymiseen asti. Erityiset vaikutukset kuten esimerkiksi hyperplasia, hilseileminen, värin muutokset, halkeamat, ruvet ja karvojenlähtö on otettava huomioon.

Tähän liittyviä tietoja voidaan saada myös eläimillä tehtävistä ei-akuuttisista altistuskokeista (katso lauseketta R48 koskevat huomautukset jaksossa 2.d). Vaikutuksia pidetään merkittävänä, jos ne vastaavat edellä kuvattuja vaikutuksia.

- Aineet ja valmisteet, jotka aiheuttavat ihmisillä merkittävää ihotulehdusta, kun kosketus on ollut välitön, jatkuva tai toistuva.
- Orgaaniset peroksidit, paitsi jos on olemassa näyttöä siitä, että tällaista vaikutusta ei ole.

Tuntoharha ('paresthesia'):

Pyretroiditorjunta-aineen ihokosketuksen aiheuttamaa tuntoharhaa ihmisessä ei pidetä ärsytysvaikutuksena, joka oikeuttaisi luokituksen Xi; R38. S-lauseketta S24 on kuitenkin sovellettava aineisiin, joilla on tällainen vaikutus.

(Ne concerne pas la version ES)

(Ne concerne pas la version DA)

(Ne concerne pas la version DE)

(Ne concerne pas la version EL)

(Ne concerne pas la version EN)

(Ne concerne pas la version FR)

(Ne concerne pas la version IT)

(Ne concerne pas la version NL)

(Ne concerne pas la version PT)

(Ne concerne pas la version SV)

6.2. Conseils de prudence pour les substances et les préparations

DE:

S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben)

— Anwendungsbereich:

- sehr giftige, giftige oder ätzende Stoffe und Zubereitungen;

— Verwendung:

- *obligatorisch* für sehr giftige Stoffe und Zubereitungen;
- empfohlen für sonstige obengenannte Stoffe und Zubereitungen, insbesondere, wenn Wasser nicht die geeignete Spülflüssigkeit ist;
- empfohlen für ätzende Stoffe und Zubereitungen, die an die allgemeine Öffentlichkeit abgegeben werden.

(Ne concerne pas la version ES)

(Ne concerne pas la version DA)

(Ne concerne pas la version EL)

(Ne concerne pas la version EN)

(Ne concerne pas la version FR)

(Ne concerne pas la version IT)

(Ne concerne pas la version NL)

(Ne concerne pas la version PT)

(Ne concerne pas la version FI)

(Ne concerne pas la version SV)

FI:

S 29 Ei saa tyhjentää viemäriin

— Soveltamisala:

- erittäin helposti syttyvät tai helposti syttyvät veteen sekoittumattomat nesteet,
- erittäin myrkylliset tai myrkylliset aineet ja valmisteet,
- ympäristölle vaaralliset aineet.

— Käytön perusteet:

- *pakollinen* yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville ympäristölle vaarallisille ja tunnuksella N luokitelluille aineille, jollei kyseessä ole aineen tarkoitettu käyttö,
- suositeltava yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville muille edellä mainituille aineille tai valmisteille, jollei kyseessä ole kemikaalin tarkoitettu käyttö.

(Ne concerne pas la version ES)

(Ne concerne pas la version DA)

(Ne concerne pas la version DE)

(Ne concerne pas la version EL)

(Ne concerne pas la version EN)

(Ne concerne pas la version FR)

(Ne concerne pas la version IT)

(Ne concerne pas la version NL)

(Ne concerne pas la version PT)

(Ne concerne pas la version SV)

—

ANNEXE 6

«ANNEXE IX

PARTIE A

Dispositions relatives aux fermetures de sécurité pour les enfants

Outre les dispositions de l'article 22, paragraphe 1, point e), de la directive, 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 la directive, 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".

DIRECTIVE 2000/33/CE DE LA COMMISSION**du 25 avril 2000****portant vingt-septième 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 (*)****(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)**

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

vu le traité instituant la Communauté européenne,

Article premier

vu la directive 67/548/CEE du Conseil du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses ⁽¹⁾, modifiée en dernier lieu par la directive 1999/33/CE du Parlement européen et du Conseil ⁽²⁾, et notamment son article 28,

Les textes des annexes I et II de la présente directive sont ajoutés à la partie B de l'annexe V de la directive 67/548/CEE.

considérant ce qui suit:

Article 2

- (1) L'annexe V de la directive 67/548/CEE définit les méthodes permettant de déterminer les propriétés physico-chimiques, la toxicité et l'écotoxicité des substances et préparations. L'adaptation au progrès technique de cette annexe est nécessaire.
- (2) L'article 7, paragraphe 2, de la directive 86/609/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques ⁽³⁾ dispose «qu'il ne sera pas effectué d'expérience s'il existe une possibilité raisonnable et pratique d'avoir recours à une autre méthode scientifiquement acceptable et n'impliquant pas l'utilisation d'un animal pour obtenir le résultat recherché».
- (3) La Commission entend introduire à l'annexe V de la directive 67/548/CEE des méthodes d'essais de remplacement qui ne nécessitent pas d'utiliser un animal afin que ces méthodes soient disponibles pour tester les substances chimiques aux termes de l'article 3, paragraphe 1, de la directive 67/548/CEE.
- (4) Les mesures prévues par la présente directive sont conformes à l'avis du comité pour l'adaptation au progrès technique des directives visant à l'élimination des entraves techniques aux échanges dans le secteur des substances et préparations dangereuses,

1. Les États membres mettent en vigueur les dispositions législatives, réglementaires et administratives nécessaires pour se conformer à la présente directive au plus tard le 1^{er} octobre 2001. Ils en informent immédiatement la Commission.

Lorsque les États membres adoptent ces dispositions, celles-ci contiennent une référence à la présente directive ou sont accompagnées d'une telle référence lors de leur publication officielle. Les modalités de cette référence sont adoptées par les États membres.

2. Les États membres communiquent à la Commission les principales dispositions législatives de droit national qu'ils adoptent dans le domaine concerné par la présente directive et un tableau de correspondance entre la présente directive et les dispositions nationales adoptées.

Article 3

La présente directive entre en vigueur le troisième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*.

Article 4

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 25 avril 2000.

Par la Commission
Margot WALLSTRÖM
Membre de la Commission

(*) Adoptée avant la vingt sixième adaptation.

⁽¹⁾ JO 196 du 16.8.1967, p. 1.

⁽²⁾ JO L 199 du 30.7.1999, p. 57.

⁽³⁾ JO L 358 du 18.12.1986, p. 1.

ANNEXE I

«B.40. CORROSION CUTANÉE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Le Centre européen pour la validation de méthodes alternatives (CEVMA ou ECVAM) du Centre commun de recherche de la Commission européenne a reconnu la validité scientifique de deux essais *in vitro* de corrosivité cutanée, l'essai de résistance électrique transcutanée (RET) sur peau de rat et un essai utilisant un modèle de peau humaine (1) (2) (3). L'étude de validation du CEVMA a montré que les deux essais permettent de faire la distinction de manière fiable entre substances corrosives et non corrosives pour la peau. En outre, le protocole d'essai basé sur un modèle de peau humaine a permis de faire une distinction correcte entre les différents degrés de corrosivité (effet corrosif sévère pour la peau, R35, et effet corrosif pour la peau, R34) (2). La description et le mode opératoire sont présentés pour chacun des deux essais; le choix de l'essai dépend des exigences et préférences de l'utilisateur.

Voir aussi l'introduction générale de la partie B.

1.2. Définitions

Corrosion cutanée: la survenue de lésions irréversibles de la peau après l'application d'un matériel d'essai.

1.3. Substances de référence

Aucune substance de référence n'est spécifiée, mais voir les points 1.5.3.4 et 1.7.2.3.

1.4. Principe de la méthode d'essai — Essai RET sur peau de rat

Le matériel d'essai est appliqué pour une durée n'excédant pas 24 heures sur la surface épidermique de disques de peau prélevés sur la peau de jeunes rats humainement sacrifiés. Les matières corrosives sont identifiées sur la base de leur capacité de provoquer la perte de l'intégrité du *stratum corneum* normal et de la fonction de barrière, cette perte étant mesurée comme une diminution de la RET de base jusqu'à un niveau situé en dessous d'une valeur seuil (5 k Ω) (4) (5). Les substances irritantes ou non irritantes ne font pas baisser la RET en dessous de ce seuil. Pour les substances tensio-actives et les substances organiques neutres, une étape de fixation d'un colorant peut être incluse dans la procédure d'essai [pour la définition, voir la référence (6)] afin de réduire le nombre de faux positifs obtenus spécifiquement avec ces types de substances chimiques (2) (7).

1.5. Description de la méthode d'essai — Essai RET sur peau de rat

1.5.1. Animaux

Il est nécessaire d'utiliser de jeunes (20-23 jours) rats (Wistar ou souche comparable) pour la préparation des disques de peau. Les poils du dos et des flancs sont coupés soigneusement à l'aide d'une tondeuse pour petits animaux. Les animaux sont ensuite nettoyés soigneusement avec un linge humide, la zone tondu étant plongée dans une solution antibiotique (contenant, par exemple, de la streptomycine, de la pénicilline, du chloramphénicol et de l'amphotéricine à des concentrations efficaces pour inhiber la croissance bactérienne). Les animaux sont lavés une nouvelle fois avec des antibiotiques le troisième et le quatrième jour après le premier lavage, et doivent ensuite être utilisés dans un délai de 3 jours (pour la préparation de la peau, les animaux ne doivent pas être âgés de plus de 31 jours).

1.5.2. Préparation des disques cutanés

Les animaux sont sacrifiés humainement. On prélève la peau dorsale de chaque animal et on la débarrasse soigneusement du tissu adipeux en excès. La peau est placée sur l'extrémité d'un tube PTFE (polytétrafluoroéthylène) en veillant à ce que la surface épidermique soit en contact avec le tube. Après avoir monté à force un joint torique en caoutchouc sur l'extrémité du tube pour maintenir la peau en place, on coupe le tissu excédentaire. Les dimensions du tube et du joint torique sont indiquées à la figure 1. Le joint torique en caoutchouc est ensuite soigneusement fixé de manière étanche à l'extrémité du tube PTFE à l'aide de vaseline. Le tube est introduit dans une chambre réceptrice contenant une solution de sulfate de magnésium (154 mM) dans lequel il est maintenu par une pince à ressort (figure 2).

1.5.3. Mode opératoire

1.5.3.1. Application du matériel d'essai

Des substances d'essai liquides (150 μ l) sont appliquées sur la surface épidermique à l'intérieur du tube (figure 2). Pour l'essai de substances solides, une quantité suffisante du solide est appliquée sur le disque de peau pour que la totalité de la surface de l'épiderme soit couverte. Après avoir ajouté de l'eau désionisée (150 μ l), on agite le tube doucement. Le contact entre les substances d'essai et la peau doit être maximal. Dans le cas de certains solides, ceci peut être obtenu en chauffant à 30 °C pour dissoudre la substance d'essai ou en la broyant pour obtenir des grains ou une poudre.

On utilise trois disques de peau pour chaque substance d'essai. Celle-ci est appliquée pendant 24 heures (voir aussi le point 1.5.3.4), puis éliminée par lavage avec un jet d'eau courante à 30 °C. L'élimination des substances d'essai qui se sont solidifiées dans le tube peut être facilitée par un lavage avec un jet d'eau tiède à 30 °C.

1.5.3.2. Mesures de la RET

La RET est mesurée à l'aide d'un pont de mesure en courant alternatif basse tension (par exemple AIM 401 ou 6401, ou équivalent). Avant la mesure de la résistance électrique, on réduit la tension de surface de la peau en ajoutant un volume suffisant d'éthanol à 70 % pour couvrir l'épiderme. Après quelques secondes, on enlève l'éthanol en renversant le tube, puis on hydrate le tissu par l'addition de 3 ml d'une solution de sulfate de magnésium (154 mM). Les électrodes du pont de mesure sont placées de part et d'autre du disque cutané pour prendre la mesure de la résistance en k Ω /disque cutané (figure 2). Les dimensions des électrodes et la longueur d'électrode en dessous des pinces crocodiles sont indiquées à la figure 1. La pince maintenant l'électrode intérieure (épaisse) repose sur la partie supérieure du tube PTFE pendant la mesure de la résistance, afin que la longueur d'électrode immergée dans la solution de sulfate de magnésium reste constante. L'électrode extérieure (fine) est introduite dans la chambre réceptrice de telle manière qu'elle repose sur le fond de celle-ci. La distance entre la partie inférieure de la pince à ressort et la partie inférieure du tube PTFE est maintenue constante (figure 1), cette distance influençant la valeur de résistance obtenue.

Il convient de noter que si la valeur de résistance mesurée est supérieure à 20 k Ω , ceci peut être dû au fait que de la substance d'essai recouvre la surface épidermique du disque de peau. On peut essayer d'y remédier, par exemple en fermant de façon étanche le tube PTFE avec le pouce revêtu d'un gant et en l'agitant pendant 10 secondes environ; on élimine ensuite la solution de sulfate de magnésium et on répète la mesure de la résistance avec une nouvelle solution de sulfate de magnésium.

Les valeurs moyennes de la RET sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles positifs et négatifs effectués parallèlement se situent dans les fourchettes acceptables pour la méthode. Les substances de contrôle proposées et leur fourchette acceptable pour la méthodologie et l'appareillage décrits sont les suivantes:

Contrôle	Substance	Résistance (k Ω)
Positif	10 M acide chlorhydrique (36 %)	0,5-1,0
Négatif	Eau distillée	10-25

1.5.3.3. Mode opératoire modifié pour substances tensio-actives et substances organiques neutres

Si les valeurs RET de substances d'essai qui sont des substances tensio-actives ou des substances organiques neutres sont inférieures ou égales à 5 k Ω , on peut évaluer la pénétration d'un colorant dans les tissus. Cette procédure déterminera si les résultats sont des faux positifs (2).

1.5.3.3.1. Application et élimination du colorant sulforhodamine B

Après traitement initial avec la substance d'essai, 150 μ l d'une dilution à 10 % (p/v) de sulforhodamine B dans de l'eau distillée sont appliqués sur la surface épidermique de chaque disque de peau pendant 2 heures. Les disques de peau sont lavés ensuite avec un jet d'eau courante à la température ambiante pendant environ 10 secondes pour éliminer le colorant excédentaire/non fixé. Chaque disque de peau est soigneusement enlevé du tube PTFE et placé dans un flacon (par exemple un flacon à scintillation en verre de 20 ml) contenant de l'eau désionisée (8 ml). Les flacons sont agités doucement pendant 5 minutes pour éliminer complètement tout colorant excédentaire/non fixé. Après avoir répété cette opération de rinçage, on enlève les disques de peau et on les place dans des flacons contenant 5 ml de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 30 % (p/v) dans de l'eau distillée, puis on les incube pendant une nuit à 60 °C. Après incubation, chaque disque de peau est enlevé et jeté et la solution restante est centrifugée pendant 8 minutes à 21 °C (force centrifuge relative \sim 175). Un échantillon de 1 ml de surnageant est ensuite dilué dans un rapport de 1 à 5 (v/v) [soit 1 ml + 4 ml] avec du SDS à 30 % (p/v) dans de l'eau distillée. La densité optique (DO) de la solution est mesurée à environ 565 nm.

1.5.3.3.2. Calcul de la teneur en colorant

La teneur de chaque disque en sulforhodamine B est calculée sur la base des valeurs de DO (coefficient d'extinction molaire de la sulforhodamine B à 565 nm = $8,7 \times 10^4$; poids moléculaire = 580). La teneur en sulforhodamine B est déterminée pour chaque disque de peau et on calcule ensuite une teneur moyenne en colorant pour les essais répétés. Les valeurs moyennes de la fixation du colorant sont acceptées à condition que les valeurs des contrôles effectués parallèlement se situent dans la fourchette acceptable pour la méthode. Les fourchettes acceptables de teneur en colorant pour les substances de contrôle proposées pour la méthodologie et l'appareillage décrits sont les suivantes:

Contrôle	Substance	Résistance (µg/disque)
Positif	10 M acide chorhydrique (36%)	40-100
Négatif	Eau distillée	15-35

1.5.3.4. Informations complémentaires

Les substances d'essai peuvent aussi être appliquées sur les disques cutanés pendant des durées plus courtes (2 heures, par exemple) pour identifier les substances fortement corrosives. Cependant, dans l'étude de validation, on a constaté que l'essai RET surestimait le potentiel corrosif de plusieurs substances chimiques après leur application pendant 2 heures (2), alors qu'il assurait une identification correcte des substances corrosives et non corrosives après une application de 24 heures.

Les propriétés et les dimensions de l'appareillage et le mode opératoire utilisés peuvent influencer les valeurs de la RET obtenues. Le seuil de corrosivité a été fixé à 5 kΩ sur la base de données obtenues avec l'appareillage et le mode opératoire spécifiques décrits dans cette méthode. Des valeurs de seuil et de contrôle différentes seront éventuellement nécessaires en cas de changement important des conditions d'essai. Par conséquent, il est recommandé d'étalonner la méthodologie et la valeur seuil de résistance en testant une série de substances standard de référence choisies parmi les substances chimiques utilisées dans l'étude de validation (3).

1.6. Principe de la méthode d'essai — Essai sur modèle de peau humaine

Le matériel d'essai est appliqué localement pendant 4 heures sur un modèle tridimensionnel de peau humaine comprenant un épiderme reconstitué avec un *stratum corneum* fonctionnel. Les matières corrosives sont identifiées sur la base de leur aptitude à réduire la viabilité cellulaire [déterminée, par exemple, à l'aide de l'essai de réduction du MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl) tetrazolium bromide] en dessous de valeurs seuils définies pour des périodes d'exposition déterminées. Le principe de l'essai concorde avec l'hypothèse selon laquelle les substances chimiques corrosives sont capables de pénétrer dans le *stratum corneum* (par diffusion ou érosion) et sont suffisamment cytotoxiques pour provoquer la mort cellulaire dans les couches cellulaires sous-jacentes.

1.7. Description de la méthode d'essai — Essai sur modèle de peau humaine

1.7.1. Modèles de peau humaine

Les modèles de peau humaine peuvent provenir de diverses sources mais doivent remplir certains critères. Le modèle doit avoir un *stratum corneum* fonctionnel avec une couche sous-jacente de cellules vivantes. La fonction de barrière du *stratum corneum* doit être suffisante, ce qui peut être mis en évidence en démontrant la résistance du modèle à la cytotoxicité après l'application de substances connues pour leur cytotoxicité cellulaire mais qui ne traversent normalement pas le *stratum corneum*. Le modèle doit donner des résultats reproductibles dans des conditions expérimentales définies.

La viabilité des cellules vivantes dans le modèle doit être suffisante pour qu'il soit possible de faire la distinction entre les substances de contrôle positives et négatives. La viabilité cellulaire (par exemple, mesurée par le niveau de réduction du MTT, c'est-à-dire une valeur de DO) après l'exposition à la substance de contrôle négative doit se situer dans des limites acceptables pour le modèle en question. De même, les valeurs de viabilité cellulaire avec la substance de contrôle positive (par rapport à celles du contrôle négatif) doivent se situer dans des limites déterminées. Le plus important est que le modèle prédictif utilisé doit être conforme aux normes de validation internationales (2).

1.7.2. Mode opératoire

1.7.2.1. Application du matériel d'essai

Pour les substances liquides, il faut appliquer une quantité suffisante de substance d'essai pour couvrir la surface cutanée (25 µl/cm² au minimum). Pour les substances solides, il faut appliquer une quantité suffisante de substance d'essai pour couvrir la peau et ensuite l'humidifier pour assurer un bon contact avec la peau; si nécessaire, les substances solides doivent être réduites en poudre avant leur application. La méthode d'application doit convenir à un large éventail de substances chimiques (2). À la fin de la période d'exposition, le matériel d'essai doit être enlevé soigneusement de la surface cutanée avec une solution saline.

1.7.2.2. Mesures de la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules peut être mesurée à l'aide de toute méthode quantitative validée. La méthode la plus fréquemment utilisée est la réduction du MTT, dont on a constaté l'exactitude et la reproductibilité des résultats dans différents laboratoires (2). Le disque de peau est placé dans une solution de MTT de 0,3 mg/ml à 20-28°C pendant 3 heures. Après extraction du précipité bleu de formazan (extraction par solvant), on mesure la concentration de formazan en déterminant la DO à une longueur d'onde de 545 à 595 nm.

1.7.2.3. Informations complémentaires

Le modèle de peau utilisé ainsi que le protocole exact de la durée d'exposition et des procédures de lavage, etc. auront une grande influence sur les résultats des mesures de la viabilité cellulaire. Il est recommandé d'étalonner la méthodologie et le modèle prédictif en testant une série de substances standard de référence choisies parmi les substances chimiques utilisées dans l'étude de validation du CEVMA ou ECVAM (3). Il est essentiel de démontrer que la méthode utilisée est reproductible dans un même laboratoire et entre laboratoires pour un large éventail de substances chimiques, conformément aux normes internationales. La méthode doit au moins satisfaire aux critères de validité scientifique définis précédemment (2) et les résultats de cette étude de validation doivent être publiés dans une revue scientifique faisant appel à l'évaluation par des experts (*peer-reviewed*).

2. DONNÉES

2.1. Traitement des résultats

2.1.1. Essai de RET sur peau de rat

Les valeurs de résistance ($k\Omega$) pour le matériel d'essai, les contrôles positifs et négatifs ainsi que toute substance chimique standard de référence sont présentées sous forme de tableau, y compris les données des essais répétés/répliqués, les valeurs moyennes et la classification qui en découle.

2.1.2. Essai sur modèle de peau humaine

Les valeurs de DO et les pourcentages calculés de viabilité cellulaire pour le matériel d'essai, les contrôles positifs et négatifs ainsi que toute substance chimique standard de référence sont présentés sous forme de tableau, y compris les données des essais répétés, les valeurs moyennes et la classification qui en est déduite.

2.2. Évaluation et interprétation des résultats

2.2.1. Essai de RET sur peau de rat

Si la valeur moyenne de la RET obtenue pour la substance d'essai est supérieure à $5 k\Omega$, cette substance n'est pas corrosive. Si la valeur RET est inférieure ou égale à $5 k\Omega$ et la substance d'essai n'est pas une substance tensio-active ou une substance organique neutre, cette substance est corrosive.

Dans le cas des substances tensio-actives ou des substances organiques neutres dont la valeur de la RET est inférieure ou égale à $5 k\Omega$, on peut évaluer la pénétration d'un colorant. Si la teneur moyenne en colorant du disque est supérieure ou égale à la teneur moyenne en colorant du disque du contrôle positif (HCl à 36 %) obtenue parallèlement, la substance d'essai est un vrai positif et est donc corrosive. Si la teneur moyenne en colorant du disque est inférieure à la teneur moyenne en colorant du disque du contrôle positif (HCl à 36 %) obtenue parallèlement, la substance d'essai est un faux positif et donc non corrosive.

2.2.2. Essai sur modèle de peau humaine

La valeur de la DO du contrôle négatif représente une viabilité cellulaire de 100%; par conséquent, la valeur de la DO obtenue pour chaque échantillon d'essai peut être utilisée pour calculer un pourcentage de viabilité par rapport au contrôle négatif. La valeur seuil du pourcentage de viabilité cellulaire qui établit la distinction entre les matières corrosives et les matières non corrosives (ou entre différentes classes de substances corrosives) doit être clairement définie dans le modèle prédictif avant la validation de la méthode et l'étude de validation doit ensuite montrer que la valeur seuil est appropriée (2).

3. RAPPORTS

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

Substance d'essai:

- données d'identification, nature physique et, si nécessaire, propriétés physicochimiques. Le cas échéant, des informations analogues doivent être fournies pour les substances de référence.

Conditions d'essai:

- détails du mode opératoire,
- description et justification de toute modification.

Résultats:

- présentation sous forme de tableau des valeurs des résistances (essai de RET) ou des pourcentages de viabilité cellulaire (essai sur modèle de peau humaine) pour le matériel d'essai, les contrôles positifs et négatifs ainsi que toute substance chimique standard de référence, y compris les données des essais répétés/répliqués et les valeurs moyennes,
- description de tout autre effet observé.

*Discussion des résultats**Conclusions***4. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, S. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhtter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, S. 483-524.
- (3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, p. 471-482.
- (4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, p. 507-512.
- (5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, p. 191-194.
- (6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA* 26, p. 709-720.
- (7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, *ATLA* 23, p. 219-255.

Figure 1

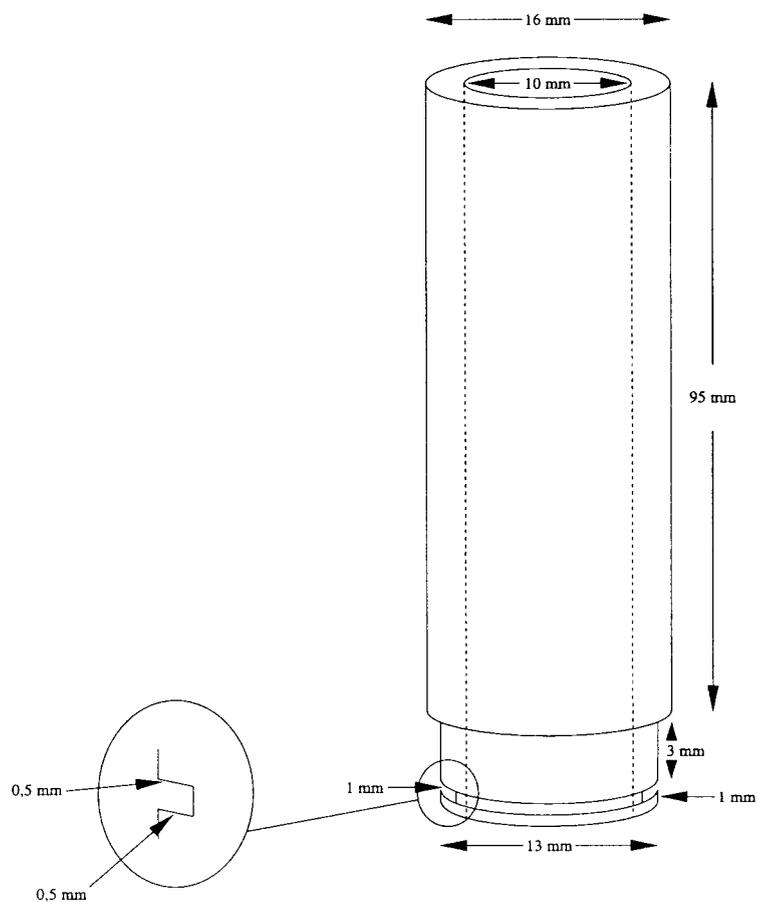
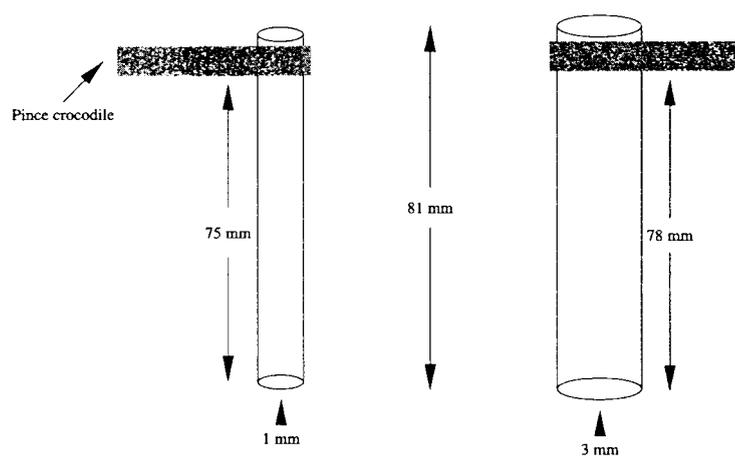
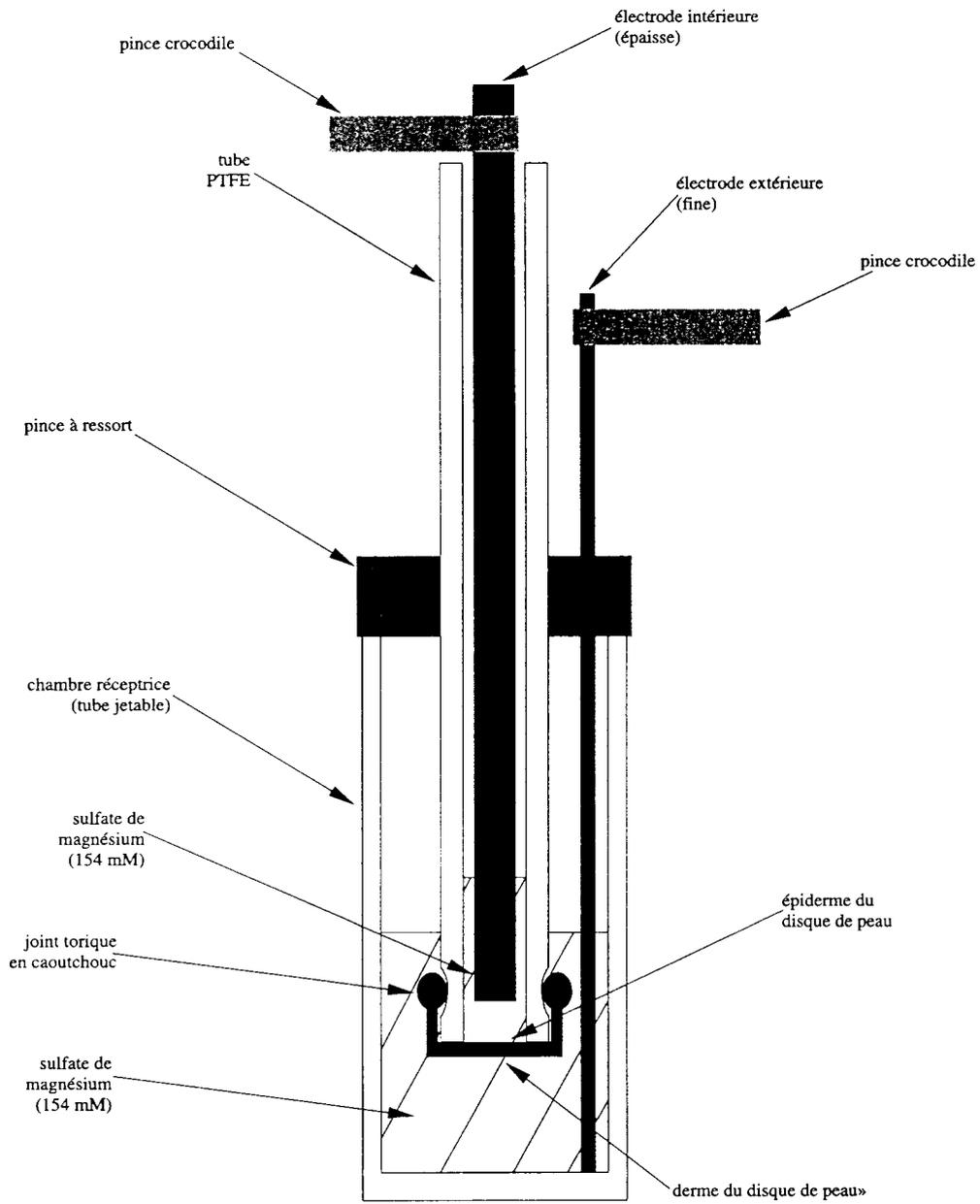
Dimensions du tube PTFE**Dimensions des électrodes**

Figure 2

Appareillage pour l'essai RET sur peau de rat



ANNEXE II

«B.41. PHOTOTOXICITÉ — ESSAI DE PHOTOTOXICITÉ *IN VITRO* 3T3 NRU

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

La phototoxicité est définie comme une réaction toxique déclenchée par une première exposition de la peau à certains produits chimiques, suivie d'une exposition à la lumière, ou bien par l'irradiation de la peau après administration d'un produit chimique par voie systémique.

Les informations fournies par le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU permettent de déterminer le potentiel phototoxique d'une substance d'essai, c'est-à-dire les dangers qu'elle est susceptible de présenter (ou son absence de dangers) en cas d'exposition au rayonnement UV et à la lumière visible.

Dans la mesure où la finalité toxicologique du test *in vitro* est de déterminer la photocytotoxicité induite par l'action combinée d'un produit chimique et de la lumière, les composés qui se révèlent phototoxiques *in vivo* après administration systémique et diffusion dans la peau, ainsi que les composés qui ont une action photo-irritante après application topique sur la peau peuvent être détectés par ce test.

Le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU a été élaboré et validé dans le cadre d'un projet conjoint UE/COLIPA entre 1992 et 1997 (1) (2) (3), visant à trouver une méthode *in vitro* valable pour remplacer les divers tests *in vivo* utilisés. En 1996, l'OCDE avait recommandé, à l'issue d'un groupe de travail, une approche séquentielle *in vitro* pour l'évaluation de la toxicité (4).

Les résultats du test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU ont été comparés aux effets de phototoxicité/photo-irritation aiguë *in vivo* chez les animaux et chez les humains, et le test s'est révélé extrêmement fiable pour la prévision de ces effets. Le test n'est pas conçu pour prévoir d'autres effets nocifs susceptibles de résulter de l'action combinée d'un produit chimique et de la lumière, tels que la photogénotoxicité, la photo-allergie, et la photocarcinogénicité, mais de nombreux produits chimiques qui possèdent des propriétés spécifiques donneront des résultats positifs au test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU. Par ailleurs, le test ne permet pas non plus d'évaluer le pouvoir phototoxique.

L'appendice propose une approche séquentielle pour les essais visant à déterminer la phototoxicité des produits chimiques.

1.2. Définitions

Irradiance: l'intensité du rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, mesurée en W/m^2 ou en mW/cm^2 .

Dose de lumière: la quantité (=intensité×temps) de rayonnement ultraviolet (UV) ou visible incident sur une surface, exprimée en Joules (=W×s) par unité de surface, par exemple, J/m^2 ou J/cm^2 .

Bandes de longueurs d'ondes de la lumière UV: Les désignations recommandées par la CIE (Commission internationale de l'éclairage) sont: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) et UVC (100-280 nm). D'autres désignations sont également utilisées: la limite entre UVB et UVA est souvent placée à 320 nm, et les UVA peuvent être subdivisés en UV-A1 et UV-A2 avec une limite à environ 340 nm.

Viabilité cellulaire: paramètre mesurant l'activité totale d'une population cellulaire (par exemple, absorption du colorant vital rouge neutre dans les lysosomes cellulaires), qui, en fonction de l'effet mesuré et du type de test utilisé, correspond au nombre total et/ou à la vitalité des cellules.

Viabilité cellulaire relative: viabilité cellulaire exprimée par rapport aux témoins négatifs (solvant) qui ont été prélevés tout ou long de la procédure (soit +UV soit -UV), mais non traités par un produit chimique.

Modèle prédictif: algorithme utilisé pour transformer les résultats d'un test de toxicité en une prévision du potentiel toxique. Dans les présentes lignes directrices d'essai, le PIF et le MPE peuvent être utilisés pour transformer les résultats du test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU en une prévision du potentiel phototoxique.

PIF (Photo Irritation Factor — Facteur de photo-irritation): facteur obtenu en comparant deux concentrations cytotoxiques efficaces (EC_{50}) de la substance chimique d'essai, obtenues en présence (+UV) et en absence (-UV) d'une irradiation non cytotoxique par un rayonnement UVA/visible.

MPE (Mean Photo Effect — Photo-effet moyen): nouvelle mesure dérivée d'une analyse mathématique du tracé complet de deux courbes concentration-réponse obtenues avec (+UV) ou sans (-UV) irradiation non cytotoxique par un rayonnement UVA/visible.

Phototoxicité: réaction toxique aiguë apparaissant après une première exposition de la peau à certains produits chimiques et exposition subséquente à la lumière, ou déclenchée par l'irradiation de la peau après administration systémique d'un produit chimique.

Photo-irritation: terme désignant une sous-catégorie de "phototoxicité", utilisé pour décrire uniquement les réactions phototoxiques qui se manifestent au niveau de la peau après exposition (par voie topique ou orale) à des produits chimiques. Ces réactions phototoxiques entraînent toujours des dommages cellulaires non spécifiques (réactions de type coup de soleil).

Photo-allergie: réactivité immunologique acquise qui ne se manifeste pas lors de la première exposition à la lumière et au produit chimique et nécessite une période d'induction d'une ou de deux semaines avant que la réactivité cutanée puisse être mise en évidence.

Photogénotoxicité: réaction génotoxique observée pour un paramètre génétique, qui apparaît après exposition des cellules à une dose non génotoxique de lumière UV/visible et à un produit chimique non génotoxique.

Photocancérogénicité: cancérogénicité induite par une exposition répétée à la lumière et à un produit chimique. Le terme "photocancérogénicité" s'emploie lorsque l'effet tumorigène induit par les UV est accentué par l'exposition à un produit chimique.

1.3. Substances de référence

Outre la substance chimique chlorpromazine servant de témoin positif qui doit être testée concurremment dans chaque cas, il est recommandé d'utiliser comme substances de référence pour le test de phototoxicité 3T3 NRU un sous-ensemble des produits chimiques utilisés pour ce test lors des essais interlaboratoires (1) (3) (13).

1.4. Remarques initiales

Des effets phototoxiques ont été signalés pour de nombreux types de produits chimiques (5) (6) (7) (8). Le seul point commun entre ces derniers est leur capacité à absorber l'énergie lumineuse dans le domaine de la lumière solaire. D'après la première loi de photochimie (loi de Grotthaus-Draper) la photoréaction nécessite l'absorption d'un nombre suffisant de quanta de lumière. Aussi convient-il, avant d'envisager un essai biologique selon les présentes lignes directrices, de déterminer le spectre d'absorption UV/lumière visible du produit chimique à tester (par exemple, suivant les lignes directrices d'essai 101 de l'OCDE). Si le coefficient d'extinction/d'absorbance molaire est inférieur à $10 \text{ litre} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, le produit chimique n'a pas de potentiel photoréactif et il est inutile de le soumettre au test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU ou à tout autre test biologique visant à détecter des effets photochimiques indésirables (appendice).

1.5. Principe de la méthode d'essai

Quatre mécanismes ont été mis en évidence pour expliquer comment l'absorption de lumière par un chromophore (chimique) peut entraîner une réaction phototoxique (7). Tous ces mécanismes entraînent des dommages cellulaires. Par conséquent, le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU repose sur la comparaison de la cytotoxicité d'un produit chimique avec et sans exposition à une dose non cytotoxique d'UVA/lumière visible. Dans ce test, la cytotoxicité est exprimée comme la diminution, en fonction de la concentration, de la fixation du colorant vital rouge neutre [Neutral Red — NR (9)] 24 heures après traitement par le produit chimique à tester et irradiation.

Des cellules Balb/c 3T3 sont maintenues en culture pendant 24 h jusqu'à obtention de monocouches. Pour chaque produit chimique à tester, deux plaques à 96 puits sont alors préincubées pendant 1 h avec huit concentrations distinctes du produit chimique. Ensuite, l'une des deux plaques est exposée à une dose d'UVA/lumière visible non cytotoxique de 5 J/cm^2 UVA (expérience +UV), tandis que l'autre plaque est maintenue à l'obscurité (expérience -UV). Dans les deux plaques, le milieu de traitement est ensuite remplacé par un milieu de culture et, après une nouvelle période d'incubation de 24 h, la viabilité cellulaire est déterminée par le test de fixation du rouge neutre (Neutral Red Uptake — NRU) pendant 3 h. La viabilité cellulaire relative, exprimée sous forme d'un pourcentage des témoins négatifs non traités, est calculée pour chacune des huit concentrations d'essai. Afin de prévoir le potentiel phototoxique, les réponses aux concentrations obtenues en présence (+UV) et en absence (-UV) d'irradiation sont comparées, généralement au niveau EC_{50} , c'est-à-dire la concentration inhibant la viabilité cellulaire de 50 % par rapport aux témoins non traités.

1.6. Critères de qualité

Sensibilité des cellules aux UVA, données historiques: la sensibilité des cellules aux UVA doit être régulièrement contrôlée. Les cellules sont mises en culture à la densité utilisée dans le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU; elles sont irradiées le jour suivant par des doses d'UVA allant de 1 à 9 J/cm^2 , et la viabilité cellulaire est déterminée un jour plus tard à l'aide du test NRU. Les cellules répondent aux critères de qualité si leur viabilité après irradiation par 5 J/cm^2 UVA est supérieure ou égale à 80 % de la viabilité des témoins maintenus à l'obscurité. À la dose la plus forte de 9 J/cm^2 UVA, la viabilité doit être au moins égale à 50 % de celle des témoins conservés à l'obscurité. Ce contrôle doit être répété tous les 10 passages de cellules environ.

Sensibilité aux UVA des cellules constituant les témoins négatifs, dans le test en cours: le test répond aux critères de qualité si les témoins négatifs [cellules dans une solution saline équilibrée de Earl — Earl's Balanced Salt Solution (EBSS)] avec ou sans 1 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) ou 1 % d'éthanol (EtOH) dans l'expérience +UVA ont une viabilité supérieure ou égale à 80 % de celle des cellules non irradiées dans le même solvant dans l'expérience menée en parallèle dans l'obscurité (-UVA).

Viabilité des témoins négatifs: la densité optique absolue ($OD_{540 \text{ NRU}}$), mesurée dans l'extrait NR des témoins négatifs indique si les 1×10^4 cellules mises en culture par puits se sont développées avec un temps de doublement normal pendant les deux jours d'essai. Un test répond aux critères d'acceptation si la densité optique moyenne $OD_{540 \text{ NRU}}$ des témoins non traités est $\geq 0,2$.

Témoin positif: pour chaque test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU réalisé, un produit chimique phototoxique connu doit être testé concurrentement. La chlorpromazine (CPZ) a été utilisée comme témoin positif dans l'étude de validation UE/COLIPA et est donc recommandée. Dans le cas de la CPZ testée selon le protocole standard dans le test *in vitro* 3T3 NRU, les critères d'acceptation suivants ont été définis: CPZ irradiée (+UVA): $EC_{50} = 0,1$ à $2,0 \mu\text{g/ml}$, CPZ non irradiée (-UVA): $EC_{50} = 7,0$ à $90,0 \mu\text{g/ml}$. Le facteur de photo-irritation (PIF), c'est-à-dire la variation de l' EC_{50} doit être d'au moins 6.

À la place de la CPZ, d'autres produits chimiques phototoxiques connus, convenant à la classe chimique ou aux caractéristiques de solubilité du produit chimique à tester, peuvent aussi être utilisés en tant que témoins positifs parallèles. Dans ce cas, en fonction des données historiques, les intervalles de valeurs de la EC_{50} et le PIF ou le MPE (Mean Photo Effect — photo-effet moyen) doivent être correctement définis en tant que critères d'acceptation du test.

1.7. Description de la méthode d'essai

1.7.1. Préparations

1.7.1.1. Cellules

Une lignée permanente de cellules de fibroblaste de souris — Balb/c 3T3, clone 31 — provenant de ATCC (American Type Culture Collection) ou de ECACC (European Collection of Cell Cultures) a été utilisée dans l'étude de validation et est donc recommandée. D'autres cellules ou lignées cellulaires peuvent aussi donner de bons résultats avec le même protocole d'essai si les conditions de culture sont adaptées aux besoins spécifiques des cellules; il convient toutefois d'en démontrer l'équivalence.

Les cellules doivent être régulièrement contrôlées pour vérifier l'absence de contamination par des mycoplasmes, et ne doivent être utilisées que si les résultats du contrôle sont satisfaisants.

Dans la mesure où la sensibilité aux UVA des cellules peut augmenter avec le nombre de passages, il convient d'utiliser des cellules Balb/c 3T3 ayant subi le moins de passages possibles, de préférence moins de 100. Il importe de contrôler régulièrement la sensibilité aux UVA des cellules Balb/c 3T3 selon la procédure de contrôle de la qualité décrite dans les présentes lignes directrices.

1.7.1.2. Milieux et conditions de culture

Des milieux de culture et des conditions d'incubation appropriés doivent être utilisés pour le passage systématique des cellules et pendant la procédure d'essai. Pour les cellules Balb/c 3T3, le milieu de culture est du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) enrichi avec 10% de sérum de veau nouveau-né, 4 mM de glutamine, de pénicilline et de streptomycine, et incubé à 37°C en atmosphère humidifiée/7,5% CO_2 . Il est particulièrement important que les conditions de culture cellulaire permettent de maintenir la durée du cycle cellulaire dans les limites normales pour les cellules ou la lignée cellulaire utilisées.

1.7.1.3. Préparation des cultures

Des cellules provenant de cultures mères congelées sont mises en culture à une densité appropriée dans le milieu de culture, et sont repiquées au moins une fois avant d'être utilisées pour le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU.

Pour le test de phototoxicité, le milieu de culture estensemencé avec une densité de cellules telle que les cultures n'arrivent pas à confluence avant la fin de l'essai, c'est-à-dire au moment où la viabilité cellulaire est déterminée, 48 h après la mise en culture des cellules. Pour les cellules Balb/c 3T3 cultivées sur des plaques à 96 puits, la densité cellulaire recommandée est de 1×10^4 cellules par puits.

Pour chaque produit chimique testé, les cellules sont mises en culture de manière identique sur deux plaques à 96 puits distinctes, qui sont utilisées en même temps pendant toute la procédure d'essai, dans les mêmes conditions de culture, sauf pendant la période où l'une des plaques est irradiée (+UVA/lumière visible) et l'autre maintenue à l'obscurité (-UVA/lumière visible).

1.7.1.4. Activation métabolique

Alors que l'utilisation de systèmes d'activation métabolique est nécessaire en règle générale pour tous les tests *in vitro* de prédiction du potentiel génotoxique ou cancérigène, dans le cas de la phototoxicologie, on ne connaît pas jusqu'à présent de produit chimique qui nécessite une transformation métabolique pour agir comme une phototoxine *in vivo* ou *in vitro*. Par conséquent, il ne paraît pas utile ni scientifiquement fondé de réaliser le présent test en présence d'un système d'activation métabolique.

1.7.1.5. Produit chimique à tester/Préparation

Les produits chimiques à tester doivent être fraîchement préparés juste avant utilisation, à moins que les données de stabilité ne démontrent qu'ils sont conservables. Une préparation en lumière rouge peut s'avérer nécessaire lorsqu'une photodégradation rapide est probable.

Les produits chimiques à tester doivent être dissous dans des solutions salines tamponnées, par exemple, solution saline équilibrée de Earl (Earl's Balanced Salt Solution — EBSS) ou solution saline tamponnée au phosphate (Phosphate Buffered Saline — PBS), qui doivent être exempts de constituants protéiques et d'indicateurs pH colorés qui absorbent la lumière, afin d'éviter les interférences lors de l'irradiation.

Les produits chimiques ayant une solubilité limitée dans l'eau doivent être dissous dans des solvants appropriés à 100 fois la concentration finale souhaitée, puis dilués à raison de 1:100 avec la solution saline tamponnée. Si un solvant est utilisé, il doit être présent au volume constant de 1% (v/v) dans toutes les cultures, c'est-à-dire dans les témoins négatifs et dans toutes les concentrations du produit chimique à tester.

Les solvants recommandés sont le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthanol (EtOH). D'autres solvants de faible cytotoxicité (par exemple, l'acétone) peuvent convenir, mais leurs propriétés spécifiques doivent être évaluées avec soin, notamment les possibilités de réaction avec le produit chimique à tester, l'atténuation de l'effet phototoxique, ou les propriétés de fixation des radicaux.

Si nécessaire, on pourra recourir à un mélangeur Vortex et/ou à la sonication et/ou à un chauffage à 37°C pour faciliter la solubilisation.

1.7.1.6. Irradiation UV/Préparation

Source de lumière: le choix d'une source de lumière et d'un filtrage appropriés est le facteur déterminant dans les essais de phototoxicité. Les domaines des UVA et de la lumière visible sont généralement associés à une photosensibilisation (7) (10), tandis que les UVB sont moins importants de ce point de vue, étant directement très cytotoxiques avec une cytotoxicité qui augmente d'un facteur 1 000 entre 313 et 280 nm (11). Parmi les critères présidant au choix de la source de lumière appropriée, il est essentiel que la source de lumière émette des longueurs d'onde absorbées par le produit chimique à tester et que la dose de lumière (pouvant être obtenue dans un délai raisonnable) soit suffisante pour détecter les substances photosensibilisantes connues. En outre, les longueurs d'onde et les doses employées ne doivent pas trop endommager le système d'essai, notamment en ce qui concerne l'émission de chaleur (domaine infrarouge).

La lumière solaire simulée par les simulateurs solaires est considérée comme la source de lumière optimale. Les simulateurs solaires utilisent des arcs au xénon ainsi que des arcs au mercure (dopé) ou des arcs aux halogénures de métaux. Ces derniers ont l'avantage d'émettre moins de chaleur et d'être moins chers, mais ils ne reproduisent pas parfaitement la lumière solaire. Dans la mesure où tous les simulateurs solaires émettent d'importantes quantités d'UVB, ils doivent être équipés de filtres adéquats pour atténuer les longueurs d'onde UVB hautement cytotoxiques.

Pour l'essai de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU, il convient d'utiliser un spectre d'irradiance pratiquement exempt d'UVB (UVA:UVB ~ 1:20). Un exemple de distribution de l'irradiance spectrale du simulateur solaire équipé de filtres, qui a été utilisé dans l'étude de validation du test *in vitro* 3T3 NRU, a été publié (3).

Dosimétrie: l'intensité de lumière (irradiance) doit être régulièrement contrôlée avant chaque test de phototoxicité à l'aide d'un radiomètre UV à large bande approprié qui doit avoir été étalonné en fonction de la source. La performance du radiomètre UV doit être contrôlée. À cet effet, on recommande l'utilisation d'un second radiomètre UV de référence, du même type et étalonné de la même façon. Dans l'idéal, à intervalles plus grands, il conviendrait d'utiliser un spectroradiomètre pour mesurer l'irradiance spectrale de la source filtrée et pour vérifier l'étalonnage du radiomètre UV à large bande, mais l'utilisation de tels instruments exige des opérateurs dûment qualifiés.

L'étude de validation a établi qu'une dose de 5 J/cm² (UVA) était non cytotoxique pour les cellules Balb/c 3T3 et suffisamment puissante pour exciter même les produits chimiques faiblement phototoxiques. Pour obtenir 5 J/cm² dans un délai de 50 min, l'irradiance doit être réglée à 1,666 mW/cm². En cas d'utilisation d'une autre lignée cellulaire ou d'une source de lumière différente, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la dose d'UVA en respectant le critère selon lequel cette dose ne doit pas être nocive pour les cellules tout en étant suffisante pour détecter les phototoxines standard. La durée de l'exposition à la lumière se calcule de la façon suivante:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dose d'irradiation (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{irradiance (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

1.7.2. Conditions d'essai

La concentration maximale du produit chimique à tester ne doit pas dépasser 100 µg/ml, puis que tous les produits chimiques phototoxiques ont été détectés à des concentrations plus faibles, et qu'à des concentrations plus élevées, l'incidence des faux positifs augmente (surprédiction) (13). Le pH de la plus forte concentration du produit chimique à tester doit être satisfaisant (pH entre 6,5 et 7,8).

Les plages de concentrations du produit chimique testé en présence (+UVA) et en absence (-UVA) de lumière doivent être déterminées de manière adéquate lors d'expériences préalables. La plage et les intervalles d'une série de concentrations doivent être ajustées de telle façon que les courbes concentration-réponse soient suffisamment confirmées par les données expérimentales. Il convient de recourir à une progression géométrique des concentrations (avec un facteur de dilution constant).

1.7.3. Mode opératoire⁽¹⁾

1.7.3.1. Premier jour

Préparer une suspension cellulaire de 1×10^5 cellules/ml dans le milieu de culture, et verser 100 μ l de milieu de culture seul dans les puits périphériques d'une plaque de microtitrage à 96 puits (= essais à blanc). Dans les puits restants, verser 100 μ l de la suspension cellulaire de 1×10^5 cellules/ml (= 1×10^4 cellules/puits). Pour chaque produit chimique à tester, préparer deux plaques: une pour la détermination de la cytotoxicité (-UVA) et l'autre, pour la détermination de la phototoxicité (+UVA).

Incuber les cellules pendant 24 h (7,5% CO₂, 37°C) jusqu'à obtention d'une monocouche semi-confluente. Cette période d'incubation permet la récupération et l'adhérence des cellules, et leur croissance exponentielle.

1.7.3.2. Deuxième jour

Après incubation, décanter le milieu de culture pour séparer les cellules et laver deux fois avec 150 μ l de EBSS/PBS par puits. Ajouter 100 μ l de EBSS/PBS contenant la concentration appropriée du produit chimique à tester ou uniquement du solvant (témoin négatif). Appliquer 8 concentrations distinctes du produit chimique à tester. Incuber les cellules avec le produit chimique à tester dans l'obscurité pendant 60 minutes (7,5% CO₂, 37°C).

Pour réaliser la partie (+UVA) de l'essai, irradier les cellules à température ambiante pendant 50 minutes à travers le couvercle de la plaque à 96 puits par une dose d'UVA de 1,7 mW/cm² (= 5 J/cm²). Ventilier avec un ventilateur pour éviter la condensation d'H₂O sous le couvercle. Conserver les plaques répliques (-UVA) à température ambiante dans une boîte sombre pendant 50 min (= durée de l'exposition aux UVA).

Décanter la solution d'essai et laver deux fois avec 150 μ l de EBSS/PBS. Remplacer le EBSS/PBS par le milieu de culture et incuber (7,5% CO₂, 37°C) jusqu'au lendemain (18-22 h).

1.7.3.3. Troisième jour

Évaluation microscopique

Examiner les cellules au microscope à contraste de phase. Noter les changements morphologiques des cellules dus aux effets cytotoxiques du produit chimique testé. Ce contrôle est recommandé pour exclure les erreurs expérimentales, mais les observations ne sont pas utilisées pour l'évaluation de la cytotoxicité ou de la phototoxicité.

Test de fixation du rouge neutre

Laver les cellules avec 150 μ l de EBSS/PBS préchauffé. Éliminer la solution de lavage en tapotant légèrement. Ajouter 100 μ l de milieu NR et incuber à 37°C en atmosphère humidifiée/7,5% CO₂, pendant 3 h.

Après incubation, éliminer le milieu NR et laver les cellules avec 150 μ l de EBSS/PBS. Décanter et absorber complètement le EBSS/PBS (facultatif: centrifuger la plaque retournée).

Ajouter exactement 150 μ l de solution de désorption du NR (solution d'éthanol/acide acétique fraîchement préparé).

Passer rapidement la plaque de microtitrage à l'agitateur pendant 10 minutes, jusqu'à ce que le NR soit extrait des cellules et ait formé une solution homogène.

Mesurer la densité optique de l'extrait de NR à 540 nm dans un spectrophotomètre en utilisant les essais à blanc comme référence. Sauvegarder les données dans un format de fichier approprié (par exemple, ASCII) en vue d'une analyse ultérieure.

⁽¹⁾ Des détails supplémentaires sont donnés par la référence (12).

2. DONNÉES

2.1. Qualité et quantité des données

Les données doivent permettre une analyse significative des courbes concentration-réponse obtenues avec et sans irradiation UVA/lumière visible. Si on constate une cytotoxicité, il y a lieu d'ajuster à la fois la gamme des concentrations et l'intervalle entre chaque concentration, afin qu'il y ait concordance entre la courbe et les données expérimentales. Étant donné qu'un produit chimique peut ne pas être cytotoxique jusqu'à la concentration limite définie de 100 µg/ml dans l'expérience à l'obscurité (-UVA), mais être très cytotoxique lorsqu'il est irradié (+UVA), il peut s'avérer utile de faire différer de plusieurs ordres de grandeur les gammes de concentrations à tester dans les deux parties de l'expérience, afin de satisfaire à l'exigence de qualité des données. Si aucune cytotoxicité n'est constatée dans les deux parties de l'expérience (-UVA et +UVA), il suffit de réaliser l'essai avec un grand intervalle entre chaque dose jusqu'à la concentration maximale.

Il n'est pas nécessaire de procéder à une contre-expérience pour vérifier un résultat clairement positif. Il n'est pas non plus nécessaire de vérifier les résultats clairement négatifs, à condition que le produit chimique ait été testé à des concentrations suffisamment élevées. Dans de tels cas, une expérience principale, étayée par une ou plusieurs expériences préliminaires de détermination des gammes de concentrations, est suffisante.

Les tests qui donnent des résultats limites, proches du seuil critique du modèle prédictif, doivent être vérifiés par une contre-expérience.

Si une contre-expérience s'avère nécessaire, il peut être utile de faire varier les conditions expérimentales afin d'obtenir un résultat bien net. Une des variables clés dans ce test est la préparation des solutions du produit chimique à tester. Aussi la variation de ces conditions (cosolvant, pulvérisation, sonication) peut-elle être essentielle dans la répétition d'un test. Une autre possibilité est de faire varier le temps de préincubation. Une réduction de cette durée peut présenter un intérêt pour les produits chimiques instables dans l'eau.

2.2. Traitement des résultats

Si possible, on cherchera à déterminer la concentration du produit chimique à tester qui entraîne une inhibition de 50% de la fixation du rouge neutre par les cellules (EC_{50}). Cela peut se faire en appliquant n'importe quelle méthode de régression non linéaire appropriée (de préférence une fonction de Hill ou une régression logistique) aux données de réponse aux concentrations, ou en utilisant d'autres méthodes d'ajustement (14). Avant d'utiliser une EC_{50} pour la suite des calculs, il convient de vérifier comme il se doit la qualité de l'ajustement. Une autre solution consiste à utiliser des méthodes d'ajustement graphique pour calculer l' EC_{50} . Dans ce cas, il est recommandé d'utiliser du papier semi-logarithmique (axe des x: log, axe des y: probit) car très souvent, la fonction concentration-réponse devient pratiquement linéaire après cette transformation.

2.3. Évaluation des résultats (modèles prédictifs)

2.3.1. Modèle prédictif, version 1: facteur de photo-irritation (PIF)

Si, tant en présence (+UVA) qu'en absence (-UVA) de lumière, on obtient des courbes concentration-réponse complètes, on calcule un facteur de photo-irritation (PIF) à l'aide de la formule suivante:

$$(a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Un $PIF < 5$ indique une absence de potentiel phototoxique, alors qu'un $PIF \geq 5$ indique un potentiel phototoxique.

Si un produit chimique est cytotoxique uniquement en présence de lumière (+UVA) et n'est pas cytotoxique dans les conditions -UVA, il n'est pas possible de calculer le PIF, bien que ce résultat indique un potentiel phototoxique. Dans un tel cas, on peut calculer un ">PIF" si le test de cytotoxicité (-UV) est réalisé jusqu'à la concentration d'essai la plus élevée (C_{max}); c'est cette dernière valeur qui est utilisée pour calculer le ">PIF":

$$(b) \quad >PIF = \frac{C_{max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Si l'on ne peut obtenir qu'un ">PIF", alors toute valeur > 1 indique un potentiel phototoxique.

Si l'on ne peut calculer ni la $EC_{50}(-UV)$ ni la $EC_{50}(+UV)$ parce que le produit chimique ne fait preuve d'aucune cytotoxicité jusqu'à la concentration d'essai la plus forte, cela démontre une absence de potentiel phototoxique. Dans ce cas, on utilise un "PIF = *1" théorique pour caractériser ce résultat.

$$(c) \quad PIF = *1 = \frac{C_{max}(-UV)}{C_{max}(+UV)}$$

Si l'on ne peut obtenir qu'un "PIF = *1", cela signifie qu'il n'y a pas de potentiel phototoxique.

Dans les cas (b) et (c), les concentrations atteintes dans le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU doivent être soigneusement prises en considération lors de la détermination du potentiel phototoxique.

2.3.2. Modèle prédictif, version 2: photo-effet moyen (MPE)

À titre de variante, on peut utiliser une nouvelle version du modèle de prédiction du potentiel phototoxique, qui a été mise au point à partir des données de l'étude de validation UE/COLIPA (15) et testée en aveugle dans une étude subséquente portant sur la phototoxicité *in vitro* des substances chimiques utilisées comme filtres UV (13). Ce modèle permet de s'affranchir des limites inhérentes au modèle PIF dans les cas où l'on ne peut obtenir une EC₅₀. Ce modèle utilise le photo-effet moyen ["Mean Photo Effect" (MPE)] qui est une mesure basée sur une comparaison des courbes concentration-réponse complètes. Pour utiliser le modèle MPE, l'université Humboldt (Berlin, Allemagne) a mis au point un logiciel spécial qui peut être obtenu gratuitement.

2.4. Interprétation des résultats

Un résultat positif au test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU (PIF ≥ 5 ou MPE $\geq 0,1$) indique que la substance testée a un potentiel phototoxique. Si ce résultat est obtenu à des concentrations inférieures à 10 $\mu\text{g/ml}$, le produit chimique est aussi susceptible d'agir comme une phototoxine dans diverses conditions d'exposition *in vivo*. Si un résultat positif n'est obtenu qu'à la concentration d'essai maximale de 100 $\mu\text{g/ml}$, d'autres investigations peuvent s'avérer nécessaires pour évaluer les risques ou le pouvoir phototoxique. Il peut s'agir notamment d'étudier la pénétration et l'absorption cutanées ou l'éventuelle accumulation du produit chimique dans la peau, ou de soumettre le produit à un autre type de test pour confirmer les résultats, en utilisant par exemple un modèle de peau humaine *in vitro*.

Un résultat négatif au test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU (PIF < 5 ou MPE $< 0,1$) indique que la substance testée ne s'est pas révélée phototoxique pour les cellules de mammifère en culture dans les conditions utilisées. Dans les cas où le produit chimique a pu être testé jusqu'à la concentration maximale de 100 $\mu\text{g/ml}$, un résultat négatif indique que le produit chimique n'a pas de potentiel phototoxique et qu'une phototoxicité *in vivo* peut être considérée comme improbable. Dans les cas où l'on a obtenu des réponses toxiques identiques (EC₅₀ +UV et EC₅₀-UV) à des concentrations plus faibles, l'interprétation des résultats sera la même. En revanche, si aucune toxicité n'a été mise en évidence (+UV et -UV) et si la solubilité du produit dans l'eau a limité les concentrations à des valeurs inférieures à 100 $\mu\text{g/ml}$, il faut peut-être s'interroger sur l'adéquation du système d'essai pour la substance à tester, et envisager un test de confirmation (par exemple, un test sur un modèle de peau *in vitro* ou *ex vivo*, ou bien un test *in vivo*).

3. COMMUNICATION DES RÉSULTATS

Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes:

Produit chimique à tester:

- données d'identification et n° CAS si connu,
- nature physique et pureté,
- propriétés physicochimiques importantes pour la réalisation de l'étude,
- stabilité et photostabilité si connues.

Solvant:

- justification du choix du solvant,
- solubilité du produit chimique à tester dans ce solvant,
- pourcentage de solvant présent dans le milieu de traitement (EBSS ou PBS).

Cellules:

- type et provenance des cellules,
- absence de mycoplasmes,
- nombre de passages cellulaires, si connu,
- sensibilité des cellules aux UVA, déterminée avec l'équipement d'irradiation utilisé dans le test de phototoxicité *in vitro* 3T3 NRU.

Conditions d'essai (a); incubation avant et après traitement:

- type et composition du milieu de culture,
- conditions d'incubation (concentration de CO₂, température, humidité),
- durée de l'incubation (avant traitement et après traitement).

Conditions d'essai (b); traitement par le produit chimique:

- justification des concentrations du produit chimique utilisées en présence et en absence de rayonnement UV/lumière visible,
- en cas de solubilité limitée du produit chimique et d'absence de cytotoxicité, justification de la concentration maximale utilisée,
- type et composition du milieu de traitement (solution saline tamponnée),
- durée du traitement chimique.

Conditions d'essai (c); irradiation:

- justification de la source de lumière utilisée,
- caractéristiques d'irradiance spectrale de la source de lumière,
- caractéristiques de transmission/absorption du (des) filtre(s) utilisé(s),
- caractéristiques du radiomètre et modalités d'étalonnage,
- distance entre la source de lumière et le système d'essai,
- irradiance UVA à cette distance, exprimée en mW/cm^2 ,
- durée de l'exposition UV/lumière visible,
- dose d'UVA (irradiance \times temps), exprimée en J/cm^2 ,
- température appliquée aux cultures cellulaires durant l'irradiation et aux cultures cellulaires maintenues concurremment dans l'obscurité.

Conditions d'essai (d); test NRU:

- composition du milieu NR,
- durée de l'incubation dans NR,
- conditions d'incubation (concentration de CO_2 , température, humidité),
- conditions d'extraction du NR (agent d'extraction, durée),
- longueur d'ondes utilisée pour la lecture spectrophotométrique de la densité optique du NR,
- seconde longueur d'ondes (référence), le cas échéant,
- contenu de l'échantillon destiné à l'essai à blanc du spectrophotomètre, le cas échéant.

Résultats:

- viabilité cellulaire obtenue pour chaque concentration du produit chimique à tester, exprimée en % de la viabilité moyenne des témoins,
- courbes concentration-réponse (concentration du produit chimique — viabilité cellulaire relative) obtenues dans les expériences +UVA et -UVA parallèles,
- analyse des données fournies par les courbes concentration-réponse: si possible, calcul/détermination des EC_{50} (+UVA) et EC_{50} (-UVA),
- comparaison des deux courbes concentration-réponse obtenues en présence et en absence de rayonnement UVA/lumière visible, soit par le calcul du facteur de photo-irritation (PIF), soit par le calcul du photo-effet moyen (MPE),
- classification du potentiel phototoxique,
- critères d'acceptation de l'essai (a), témoin négatif simultané:
 - viabilité absolue (densité optique de l'extrait de NR) des cellules irradiées et des cellules non irradiées,
 - données historiques sur le témoin négatif, écart moyen et écart type,
- critères d'acceptation de l'essai (b), témoin positif simultané:
 - EC_{50} (+UVA) et EC_{50} (-UVA) et PIF du produit chimique témoin positif,
 - données historiques sur le produit chimique témoin positif: EC_{50} (+UVA) et EC_{50} (-UVA) et PIF, écart moyen et écart type.

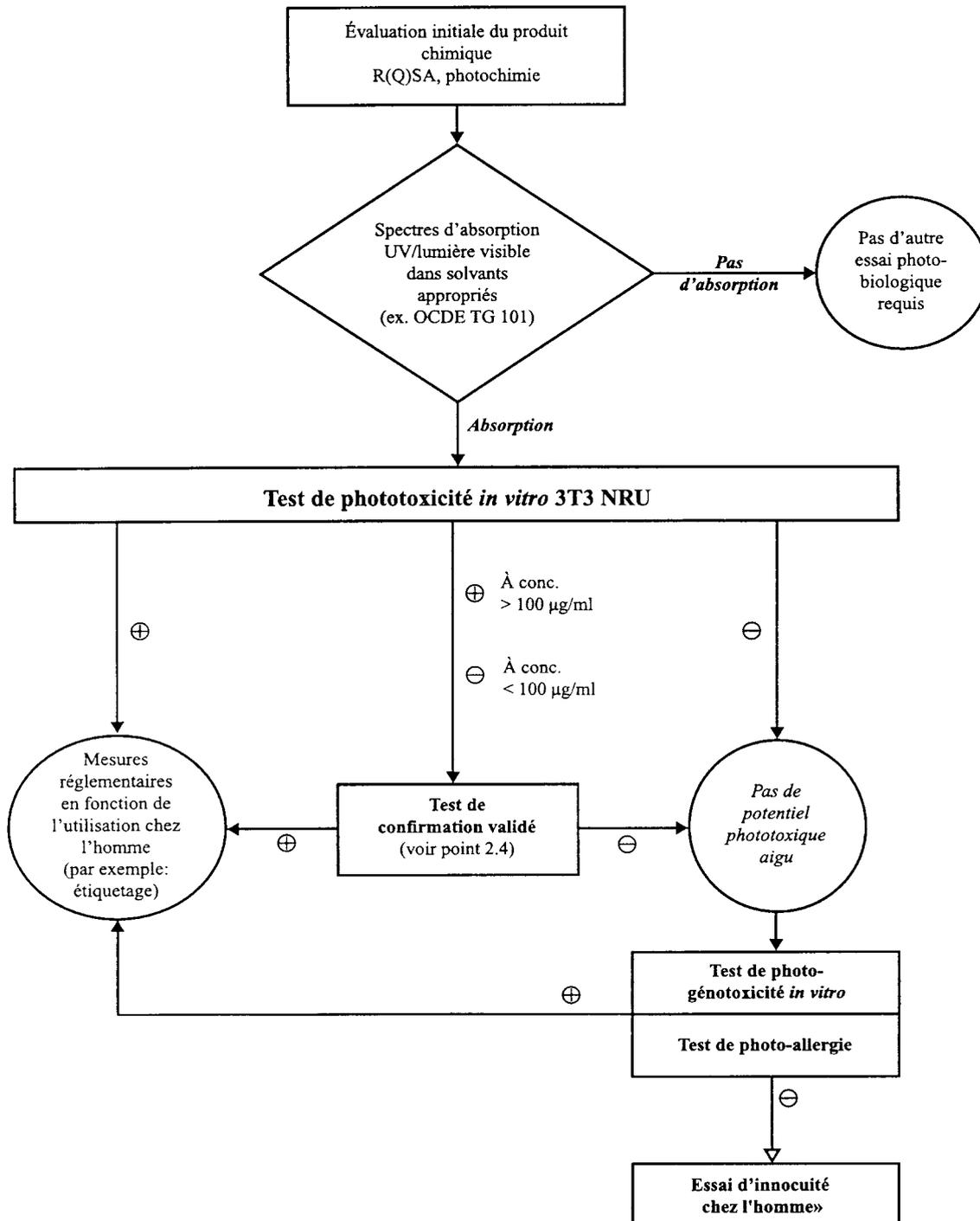
*Discussion des résultats**Conclusions*

4. RÉFÉRENCES

- (1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, p. 793-796.
- (2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA* 26, p. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA "In vitro phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, p. 305-327.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, p. 95-102.
- (6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, p. XI-XXXV.
- (7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA* 22, p. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, p. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, p. 119-124.
- (10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, p. 515-530.
- (11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, p. 1825-1829.
- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "In Vitro Photoirritation".
- (13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test, *ATLA* 26, p. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, p. 127-138.
- (15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, *ATLA* 25, p. 445-462.

Appendice

Rôle du test de phototoxicité 3T3 NRU dans une approche séquentielle des essais de phototoxicité des produits chimiques



II

(Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité)

COMMISSION

DÉCISION DE LA COMMISSION

du 19 mai 2000

rectifiant la directive 98/98/CE portant vingt-cinquième 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

[notifiée sous le numéro C(2000) 1333]

(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)

(2000/368/CE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté européenne,

vu la directive 67/548/CEE du Conseil du 27 juin 1967 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses⁽¹⁾, modifiée en dernier lieu par la directive 1999/33/CE du Parlement européen et du Conseil⁽²⁾, et notamment son article 28,

considérant ce qui suit:

(1) L'annexe VI de la directive 67/548/CEE contient un guide pour la classification et l'étiquetage des substances et préparations dangereuses. Ladite annexe VI a été modifiée en dernier lieu par l'annexe 4 de la directive 98/98/CE⁽³⁾. Les points 3.2.3, 3.2.8, 6.2 et 8 de l'annexe 4 de la directive 98/98/CE sont incomplets. Il est par conséquent nécessaire de rectifier l'annexe 4 de la directive 98/98/CE.

(2) Les mesures prévues par la présente décision sont conformes à l'avis du comité pour l'adaptation au progrès tech-

nique des directives visant à l'élimination des entraves techniques aux échanges dans le secteur des substances et préparations dangereuses,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DÉCISION:

Article premier

L'annexe 4 de la directive 98/98/CE est remplacée par l'annexe de la présente décision.

Article 2

Les États membres sont destinataires de la présente décision.

Fait à Bruxelles, le 19 mai 2000.

Par la Commission
Margot WALLSTRÖM
Membre de la Commission

⁽¹⁾ JO 196 du 16.8.1967, p. 1.

⁽²⁾ JO L 199 du 30.7.1999, p. 57.

⁽³⁾ JO L 355 du 30.12.1998, p. 1.

ANNEXE

«ANNEXE 4

1.6. Pour les substances, les données requises pour la classification et l'étiquetage peuvent être obtenues de la façon suivante:

- a) en ce qui concerne les substances qui nécessitent la communication des informations visées à l'annexe VII, la plupart des indications requises pour la classification et l'étiquetage figureront au "dossier de base". Cette classification et cet étiquetage seront revus, le cas échéant, lorsqu'on disposera d'informations supplémentaires (annexe VIII);
- b) en ce qui concerne les autres substances (par exemple celles qui sont visées au point 1.5 ci-dessus), les données requises pour la classification et l'étiquetage peuvent, le cas échéant, être obtenues à partir d'un certain nombre de sources différentes telles que les résultats d'essais antérieurs, les informations exigées au titre de la réglementation internationale des transports de matières dangereuses, les informations tirées de travaux de référence et la bibliographie ou les informations fondées sur l'expérience pratique. Il est possible de prendre également en compte les résultats de relations structure/activité validées et les avis d'experts.

Pour les préparations, les données requises pour la classification et l'étiquetage peuvent être obtenues:

- a) si elles concernent des données physico-chimiques, par l'application des méthodes visées à l'annexe V. Pour les préparations gazeuses, une méthode de calcul peut être utilisée pour les propriétés d'inflammabilité et comburantes (voir le chapitre 9);
- b) si elles concernent des données relatives aux effets sur la santé:
 - par l'application des méthodes précisées à l'annexe V et/ou par l'application de la méthode conventionnelle visée à l'article 3, paragraphe 5, points a) à i), de la directive 88/379/CEE ou, dans le cas de R 65, par l'application des règles énoncées au point 3.2.3,
 - si elles concernent toutefois l'évaluation des propriétés cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction, par l'application de la méthode conventionnelle visée à l'article 3, paragraphe 5, points j) à q), de la directive 88/379/CEE.

Note relative à la réalisation d'essais sur des animaux

La réalisation d'essais sur des animaux pour obtenir des données expérimentales est soumise aux prescriptions de la directive 86/609/CEE relative à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales.

1.7.2. *Application des critères du guide pour les substances*

Les critères d'orientation figurant dans la présente annexe sont directement applicables lorsque les données ont été obtenues par des méthodes d'essais comparables à celles qui sont reprises à l'annexe V. Dans les autres cas, on appréciera les données disponibles en comparant les méthodes d'essai utilisées avec celles qui figurent à l'annexe V et avec les règles appropriées de classification et d'étiquetage visées à la présente annexe.

Il peut arriver qu'il y ait un doute sur l'application des critères, notamment lorsque le recours à l'avis d'experts est nécessaire. Le fabricant, le distributeur ou l'importateur doit alors classer et étiqueter provisoirement la substance en cause en se basant sur une évaluation des éléments de preuve par une personne compétente.

Sans préjudice de l'article 6, dans les cas où la procédure précitée a été appliquée et où l'on craint d'éventuelles incohérences, on peut proposer la classification provisoire en vue de son introduction dans l'annexe I. Cette proposition doit être soumise à un des États membres, et être accompagnée de toutes les informations scientifiques nécessaires (voir également le point 4.1).

Une procédure similaire peut être appliquée dès lors que de nouvelles informations permettent de mettre en doute l'exactitude d'une entrée existante contenue dans l'annexe I.

2.2.2.1. *Remarques relatives aux peroxydes*

En ce qui concerne les propriétés explosibles, un peroxyde organique ou une préparation de peroxyde organique sont classés, sous la forme sous laquelle ils sont mis sur le marché, selon les critères énoncés au point 2.2.1, sur la base d'essais réalisés conformément aux méthodes décrites à l'annexe V.

En ce qui concerne les propriétés comburantes, les méthodes existant à l'annexe V ne peuvent pas s'appliquer aux peroxydes organiques.

Pour les substances, les peroxydes organiques qui ne sont pas déjà classés comme explosibles sont classés comme dangereux sur la base de leur structure (par exemple, R-O-O-H; R₁-O-O-R₂).

Les préparations qui ne sont pas déjà classées comme explosibles seront classées à l'aide de la méthode de calcul basée sur la présence d'oxygène actif, présentée au point 9.5.

Tout peroxyde organique ou toute préparation de peroxyde organique qui ne sont pas déjà classés comme explosibles sont classés comme comburants si le peroxyde ou sa formulation contient:

- plus de 5 % de peroxydes organiques
- ou
- plus de 0,5 % d'oxygène disponible à partir des peroxydes organiques et plus de 5 % de peroxyde d'hydrogène.

3.2.3. Substances et préparations nocives

Les substances et préparations seront classées comme nocives et caractérisées par le symbole "Xn" et l'indication de danger "nocif" conformément aux critères énoncés ci-dessous. Les phrases indiquant les risques seront attribuées conformément aux critères suivants:

R 22 Nocif en cas d'ingestion

Toxicité aiguë:

- DL₅₀ par voie orale, rat: $200 < DL_{50} \leq 2\ 000$ mg/kg,
- dose discriminante par voie orale, rat, 50 mg/kg: survie égale à 100 %, mais toxicité manifeste,
- survie inférieure à 100 % à 500 mg/kg par voie orale, rat (méthode de la dose fixée). Se reporter au tableau d'évaluation de la méthode d'essai B1 bis de l'annexe V.

R 21 Nocif par contact avec la peau

Toxicité aiguë:

- DL₅₀ par voie cutanée, rat ou lapin: $400 < DL_{50} \leq 2\ 000$ mg/kg.

R 20 Nocif par inhalation

Toxicité aiguë:

- CL₅₀ par inhalation, rat, pour les aérosols ou les particules: $1 < CL_{50} \leq 5$ mg/litre/4 h,
- CL₅₀ par inhalation, rat, pour les gaz ou les vapeurs: $2 < CL_{50} \leq 20$ mg/litre/4 h.

R 65 Nocif: peut provoquer une atteinte des poumons en cas d'ingestion

Les substances et préparations liquides présentant, pour l'homme, un danger en cas d'aspiration en raison de leur faible viscosité:

- a) Pour les substances et préparations contenant des hydrocarbures aliphatiques, alicycliques et aromatiques dans une concentration totale supérieure ou égale à 10 % et possédant:
 - soit un temps d'écoulement inférieur à 30 s dans une coupe ISO de 3 mm, conformément à la norme ISO 2431,
 - soit une viscosité cinématique inférieure à 7×10^{-6} m²/s à 40 °C, mesurée par un viscosimètre capillaire calibré en verre conformément à la norme ISO 3104/3105,
 - soit une viscosité cinématique inférieure à 7×10^{-6} m²/s à 40 °C, déduite de mesures par viscosimètre rotatif conformément à la norme ISO 3129.

Note: les substances et préparations répondant à ces critères ne nécessitent pas d'être classées si leur tension superficielle moyenne est supérieure à 33 mN/m à 25 °C, mesurée par tensiomètre du Nouy, ou selon les méthodes d'essai indiquées à l'annexe V, section A.5.

- b) Pour les substances et préparations, sur la base de l'expérience pratique chez l'homme.

R 40 Possibilité d'effets irréversibles

- Preuves très nettes de ce que des dommages irréversibles, différents des effets cités au chapitre 4, peuvent être provoqués par une seule exposition par une voie adéquate, généralement dans l'intervalle des valeurs précitées.

Pour indiquer le mode d'administration/exposition, on utilisera une des phrases combinées suivantes: R 40/20, R 40/21, R 40/22, R 40/20/21, R 40/20/22, R 40/21/22, R 40/20/21/22.

R 48 Risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée

- Des lésions graves (troubles fonctionnels ou modifications morphologiques caractérisés ayant une importance toxicologique) peuvent résulter d'une exposition répétée ou prolongée, par une voie adéquate.

Les substances et les préparations seront classées au moins comme toxiques lorsque ces effets sont observés à des doses de l'ordre de:

- voie orale, rat ≤ 50 mg/kg (poids corporel)/jour,
- voie cutanée, rat ou lapin ≤ 100 mg/kg (poids corporel)/jour,
- par inhalation, rat $\leq 0,25$ mg/l, 6 h/jour.

Ces valeurs indicatives peuvent s'appliquer directement lorsque les lésions graves ont été constatées au cours d'une étude de toxicité subchronique (90 jours). Pour l'interprétation des résultats d'une étude de toxicité subaiguë (28 jours), ces chiffres doivent être multipliés par trois environ. Si une étude de toxicité chronique (2 ans) est disponible, elle doit être examinée cas par cas. Si l'on dispose des résultats d'études de durées différentes, ceux de l'étude la plus longue doivent normalement être retenus.

Pour indiquer le mode d'administration/exposition, on utilisera une des phrases combinées suivantes: R 48/20, R 48/21, R 48/22, R 48/20/21, R 48/20/22, R 48/21/22, R 48/20/21/22.

3.2.3.1. Commentaires relatifs aux substances volatiles

Pour certaines substances à concentration de vapeur saturante élevée, certains éléments peuvent indiquer des effets préoccupants. De telles substances peuvent ne pas être classées selon les critères relatifs aux effets sur la santé repris dans le présent guide (point 3.2.3) ou ne pas être couvertes par les dispositions du point 3.2.8. Cependant, lorsqu'il existe des preuves adéquates que ces substances peuvent présenter un risque lié à une manipulation et à une utilisation normales, la classification à l'annexe I peut être nécessaire cas par cas.

3.2.6.1. Inflammation de la peau

La phrase de risque suivante est attribuée conformément aux critères donnés:

R 38 Irritant pour la peau

- Substances et préparations qui provoquent une inflammation importante de la peau, présente pendant au moins 24 heures après une période d'exposition ne dépassant pas quatre heures, déterminée chez le lapin conformément à la méthode d'essai d'irritation cutanée décrite à l'annexe V.

L'inflammation de la peau est importante si:

- la valeur moyenne des scores, pour l'ensemble des animaux d'essai, en ce qui concerne la formation d'érythème et d'escarre ou la formation d'œdème est égale ou supérieure à 2
- ou
- si l'essai visé à l'annexe V a été réalisé sur trois animaux, lorsque l'on a constaté la formation d'érythème et d'escarre ou la formation d'œdème équivalant à une valeur moyenne égale ou supérieure à 2 pour chaque animal, chez deux animaux au moins.

Dans les deux cas, il convient d'utiliser tous les scores obtenus à chaque lecture d'un effet (24, 48 et 72 heures) pour calculer les valeurs moyennes respectives.

L'inflammation de la peau est également importante si elle persiste sur au moins deux animaux à la fin de la période d'observation. Il convient de tenir compte des effets particuliers, par exemple hyperplasie, desquamation, décoloration, fissures, escarres et alopecie.

On peut aussi obtenir des données utiles à partir d'études d'exposition non aiguë sur les animaux (voir commentaires concernant R 48, point 2.d). Les effets sont considérés comme importants s'ils sont comparables à ceux décrits ci-dessus.

- Substances et préparations qui provoquent une inflammation importante de la peau lors d'un contact instantané, prolongé ou répété, sur la base d'observations pratiques chez l'homme.
- Peroxydes organiques, sauf s'il existe des preuves du contraire.

Paresthésie: la paresthésie provoquée chez l'homme par contact cutané avec des pesticides pyréthrinoïdes n'est pas considérée comme un effet irritant à classer Xi; R 38. Néanmoins, il convient d'appliquer la phrase S 24 aux substances qui sont susceptibles de provoquer cet effet.

3.2.8. *Autres propriétés toxicologiques*

Des phrases de risque complémentaires seront attribuées aux substances et préparations classées conformément aux points 2.2.1 à 3.2.7 ou aux chapitres 4 et 5, selon les critères suivants (sur la base de l'expérience acquise lors de l'élaboration de l'annexe I):

R 29 Au contact de l'eau, dégage des gaz toxiques

Substances et préparations qui, au contact de l'eau ou de l'air humide, dégagent des gaz très toxiques/toxiques en quantités potentiellement dangereuses; par exemple le phosphore d'aluminium, le pentasulfure de phosphore.

R 31 Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique

Substances et préparations qui réagissent avec des acides en dégageant des gaz toxiques en quantités dangereuses; par exemple l'hypochlorite de sodium, le polysulfure de baryum. En ce qui concerne les substances utilisées par le grand public, il serait préférable d'utiliser la phrase S 50: "Ne pas mélanger avec ... (à préciser par le fabricant)".

R 32 Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique

Substances et préparations qui réagissent avec des acides en dégageant des gaz très toxiques en quantités dangereuses; par exemple les sels de l'acide cyanhydrique, l'azoture de sodium. En ce qui concerne les substances utilisées par le grand public, il serait préférable d'utiliser la phrase S 50: "Ne pas mélanger avec ... (à préciser par le fabricant)".

R 33 Danger d'effets cumulatifs

Substances et préparations susceptibles de s'accumuler dans le corps humain et pouvant ainsi donner lieu à une certaine inquiétude, sans toutefois que cette accumulation soit telle qu'elle justifie l'utilisation de la phrase R 48.

R 64 Risque possible pour les bébés nourris au lait maternel

Substances et préparations qui, absorbées par des femmes, peuvent perturber l'allaitement ou qui peuvent être présentes (y compris sous forme de métabolites) dans le lait maternel en quantités suffisantes pour être préoccupantes pour la santé d'un enfant nourri au sein.

Pour les commentaires relatifs à l'emploi de cette phrase R (et dans certains cas de la phrase R 33), voir le point 4.2.3.3.

R 66 L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau

Substances et préparations qui peuvent avoir des effets préoccupants, en raison d'un dessèchement, d'une desquamation ou de gerçures, mais ne répondant pas aux critères imputables à R 38,

sur la base suivante:

- soit une observation pratique consécutive à une manipulation et une utilisation normales,
- soit des éléments de preuve pertinents concernant les effets prévus sur la peau.

Voir également les points 1.6 et 1.7.

R 67 L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges

Substances et préparations volatiles contenant des substances qui, par inhalation, peuvent provoquer des symptômes caractérisés de dépression du système nerveux central, et qui ne sont pas déjà classées d'après leur toxicité aiguë en cas d'inhalation R 20, R 23, R 26, R40/20, R 39/23 ou R 39/26).

Les éléments de preuve suivants sont utilisables:

- a) Études sur les animaux mettant en évidence des symptômes caractérisés de dépression du système nerveux central, tels qu'effets narcotiques, léthargie, manque de coordination (y compris perte du réflexe de redressement) et ataxie:
 - à des concentrations ne dépassant pas 20 mg/l pour un temps d'exposition de 4 heures
 - ou
 - si le rapport entre la concentration provoquant l'effet à ≤ 4 h et la concentration de la vapeur saturante à $20^{\circ}\text{C} \leq 1/10$.
- b) Expérience pratique sur l'homme (par exemple narcose, somnolence, vigilance réduite, perte de réflexes, manque de coordination, vertiges), sur la base de rapports dûment circonstanciés, dans des conditions d'exposition comparables à celles provoquant les effets précités sur les animaux.

Voir également les points 1.6 et 1.7.

Pour les autres phrases complémentaires de risque, voir le point 2.2.6.

- 4.1.2. Si un fabricant, un distributeur ou un importateur dispose d'informations indiquant qu'une substance devrait être classée et étiquetée conformément aux critères énoncés aux points 4.2.1, 4.2.2 ou 4.2.3, il doit étiqueter provisoirement la substance conformément à ces critères, sur la base de l'appréciation des éléments de preuve par une personne compétente.
- 4.1.3. Le fabricant, le distributeur ou l'importateur doit remettre dans les plus brefs délais, à un État membre dans lequel une substance est mise sur le marché, un document résumant toutes les informations intéressant cette substance. Ce résumé doit comporter une bibliographie contenant toutes les références pertinentes et peut comprendre toute information intéressante non publiée.
- 4.1.4. En outre, un fabricant, un distributeur ou un importateur disposant de nouvelles informations intéressant la classification et l'étiquetage d'une substance conformément aux critères indiquées aux points 4.2.1, 4.2.2 ou 4.2.3 doit remettre lesdites informations à un État membre où la substance est commercialisée.

5.2.2. *Environnement non aquatique*

- 5.2.2.1. Les substances seront classées comme dangereuses pour l'environnement et se verront attribuer le symbole "N", l'indication de danger appropriée et les phrases de risque compte tenu des critères suivants:

R 54: Toxique pour la flore

R 55: Toxique pour la faune

R 56: Toxique pour les organismes du sol

R 57: Toxique pour les abeilles

R 58: Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement

Substances qui, sur la base d'éléments disponibles concernant leurs propriétés, persistance, potentiel d'accumulation ainsi que leur devenir et leur comportement prévus ou observés dans l'environnement, pourraient présenter un danger immédiat ou à long terme et/ou différé pour la structure et/ou le fonctionnement d'écosystèmes naturels autres que ceux visés au point 5.2.1 ci-dessus. Des critères détaillés seront élaborés ultérieurement.

- 5.2.2.2. Les substances seront classées comme dangereuses pour l'environnement et se verront attribuer le symbole "N", l'indication de danger appropriée et les phrases de risque compte tenu des critères suivants:

R 59: Dangereux pour la couche d'ozone

Substances qui sur la base d'éléments disponibles concernant leurs propriétés ainsi que leur devenir et leur comportement prévus ou observés dans l'environnement, pourraient présenter un danger pour la structure et/ou le fonctionnement de la couche d'ozone stratosphérique. Cette catégorie inclut les substances figurant à l'annexe I du règlement (CE) n° 3093/94 du Conseil relatif aux substances qui détruisent la couche d'ozone (JO L 333 du 22.12.1994, p. 1) et dans ses modifications ultérieures.

6.2. **Conseils de prudence pour les substances et les préparations**

S 1 Conserver sous clé

- Applicabilité:
 - substances et préparations très toxiques, toxiques et corrosives.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations précitées si elles sont vendues au grand public.

S 2 Conserver hors de portée des enfants

- Applicabilité:
 - toutes les substances et préparations dangereuses.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour toutes les substances et préparations dangereuses vendues au grand public, à l'exception de celles uniquement classées comme dangereuses pour l'environnement.

S 3 Conserver dans un endroit frais

- Applicabilité:
 - peroxydes organiques,
 - autres substances et préparations dangereuses dont le point d'ébullition est inférieur ou égal à 40 °C.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les peroxydes organiques sauf si la phrase S 47 est utilisée,
 - recommandé pour les autres substances et préparations dangereuses dont le point d'ébullition est inférieur ou égal à 40 °C.

S 4 Conserver à l'écart de tout local d'habitation

- Applicabilité:
 - substances et préparations très toxiques et toxiques.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement aux substances et préparations très toxiques et toxiques lorsqu'il est souhaitable de compléter la phrase S 13 (lorsqu'il y a par exemple un risque d'inhalation et que ces substances ou préparations doivent être entreposées à l'écart de tout local d'habitation). Ce conseil ne vise pas à exclure l'utilisation adéquate de ces substances ou préparations dans des locaux d'habitation.

S 5 Conserver sous ... (liquide à spécifier par le fabricant)

- Applicabilité:
 - substances et préparations solides spontanément inflammables.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement aux cas spéciaux tels que le sodium, le potassium ou le phosphore blanc.

S 6 Conserver sous ... (gaz inerte à spécifier par le fabricant)

- Applicabilité:
 - substances et préparations dangereuses qui doivent être conservées en atmosphère inerte.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement aux cas spéciaux tels que certains composés organométalliques.

S 7 Conserver le récipient bien fermé

- Applicabilité:
 - peroxydes organiques,
 - substances et préparations pouvant donner lieu à des dégagements de gaz très toxiques, toxiques, nocifs, ou extrêmement inflammables,
 - substances et préparations qui, en contact avec l'humidité, donnent lieu à des dégagements de gaz extrêmement inflammables,
 - solides facilement inflammables.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les peroxydes organiques,
 - recommandé pour les autres domaines d'application précités.

S 8 Conserver le récipient à l'abri de l'humidité

- Applicabilité:
 - substances et préparations pouvant réagir violemment avec l'eau,
 - substances et préparations qui, en contact avec l'eau, donnent lieu à des dégagements de gaz extrêmement inflammables,
 - substances et préparations qui, en contact avec l'eau, donnent lieu à des dégagements de gaz très toxiques ou toxiques.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement aux domaines d'application précités lorsqu'il est nécessaire de renforcer les avertissements donnés par les phrases R 14 et R 15, en particulier, et R 29.

S 9 Conserver le récipient dans un endroit bien ventilé

- Applicabilité:
 - substances et préparations volatiles pouvant donner lieu à des dégagements de vapeurs très toxiques, toxiques ou nocives,
 - liquides extrêmement inflammables ou facilement inflammables et gaz extrêmement inflammables.
- Critères d'utilisation:
 - recommandé pour les substances et préparations volatiles pouvant donner lieu à des dégagements de vapeurs très toxiques, toxiques ou nocives,
 - recommandé pour les liquides extrêmement inflammables ou facilement inflammables ou les gaz extrêmement inflammables.

S 12 Ne pas fermer hermétiquement le récipient

- Applicabilité:
 - substances et préparations susceptibles de faire éclater leur récipient par dégagement de gaz ou de vapeurs.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement aux cas spéciaux précités.

S 13 Conserver à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour animaux

- Applicabilité:
 - substances et préparations très toxiques, toxiques et nocives.
- Critères d'utilisation:
 - recommandé lorsque de telles substances ou préparations sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S 14 Conserver à l'écart des ... (matières incompatibles à indiquer par le fabricant)

- Applicabilité:
 - peroxydes organiques.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les peroxydes organiques et limité normalement à ceux-ci. Peut toutefois être utile dans certains cas exceptionnels, lorsqu'une incompatibilité est susceptible d'entraîner un risque particulier.

S 15 Conserver à l'écart de la chaleur

- Applicabilité:
 - substances et préparations susceptibles de se décomposer ou de réagir spontanément sous l'effet de la chaleur.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement aux cas spéciaux, tels que les monomères, mais non attribué si les phrases R 2, R 3 et/ou R 5 sont déjà utilisées.

S 16 Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles — Ne pas fumer

- Applicabilité:
 - liquides extrêmement inflammables ou facilement inflammables et gaz extrêmement inflammables.
- Critères d'utilisation:
 - recommandé pour les substances et préparations précitées, sauf si les phrases R 2, R 3 et/ou R 5 sont déjà employées.

S 17 Tenir à l'écart des matières combustibles

- Applicabilité:
 - substances et préparations pouvant constituer des mélanges explosibles ou spontanément inflammables avec des matières combustibles.
- Critères d'utilisation:
 - à utiliser dans des cas spéciaux (pour insister sur les phrases R 8 et R 9, par exemple).

S 18 Manipuler et ouvrir le récipient avec prudence

- Applicabilité:
 - substances et préparations pouvant engendrer une surpression dans le récipient,
 - substances et préparations pouvant entraîner la formation de peroxydes explosifs.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement aux cas précités lorsqu'il y a un risque de lésions oculaires et/ou lorsque ces substances et préparations sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S 20 Ne pas manger et ne pas boire pendant l'utilisation

- Applicabilité:
 - substances et préparations très toxiques, toxiques et corrosives.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement aux cas spéciaux (par exemple l'arsenic et les composés d'arsenic, les fluoroacétates), notamment lorsque ces produits sont susceptibles d'être utilisés par le grand public.

S 21 Ne pas fumer pendant l'utilisation

- Applicabilité:
 - substances et préparations dont la combustion dégage des produits toxiques.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement à des cas spéciaux (composés halogénés, par exemple).

S 22 Ne pas respirer les poussières

- Applicabilité:
 - toutes les substances et préparations solides dangereuses pour la santé.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations précitées auxquelles la phrase R 42 est attribuée,
 - recommandé pour les substances et préparations mentionnées ci-dessus vendues sous forme de poussières inhalables et pour lesquelles les dangers pour la santé consécutifs à une inhalation ne sont pas connus.

S 23 Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant]

- Applicabilité:
 - toutes les substances et préparations, liquides ou gazeuses, dangereuses pour la santé.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations précitées auxquelles la phrase R 42 est attribuée,
 - obligatoire pour les substances et préparations qui sont destinées à être utilisées par pulvérisation. La phrase S 38 ou S 51 doit également être attribuée,
 - recommandé lorsqu'il est nécessaire d'attirer l'attention de l'utilisateur sur les risques d'inhalation non mentionnés dans les phrases de risque qui doivent être attribuées à ces substances.

S 24 Éviter le contact avec la peau

- Applicabilité:
 - toutes les substances et préparations dangereuses pour la santé.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations auxquelles la phrase R 43 a été attribuée, sauf si la phrase S 36 a aussi été attribuée,
 - recommandé quand il est nécessaire d'attirer l'attention de l'utilisateur sur les risques qu'entraîne un contact avec la peau, non mentionnés dans les phrases de risque qui doivent être attribuées à ces substances (par exemple paresthésie). Cette mention peut cependant être utilisée pour souligner de telles phrases.

S 25 Éviter le contact avec les yeux

- Applicabilité:
 - toutes les substances et préparations dangereuses pour la santé.
- Critères d'utilisation:
 - recommandé quand il est nécessaire d'attirer l'attention de l'utilisateur sur les risques qu'entraîne un contact avec les yeux, non mentionnés dans les phrases de risque qui doivent être attribuées. Cette mention peut cependant être utilisée pour souligner de telles phrases,
 - recommandé pour les substances auxquelles sont attribuées les phrases R 34, R 35, R 36 ou R 41 et qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S 26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste

- Applicabilité:
 - substances et préparations corrosives ou irritantes.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations corrosives ainsi que pour les substances et préparations devant porter la phrase R 41,
 - recommandé pour les substances et préparations irritantes auxquelles la phrase de risque R 36 a été attribuée.

S 27 Enlever immédiatement tout vêtement souillé ou éclaboussé

- Applicabilité:
 - substances et préparations très toxiques, toxiques ou corrosives.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations très toxiques auxquelles la phrase R 27 a été attribuée et qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public,
 - recommandé pour les substances et préparations très toxiques auxquelles la phrase R 27 a été attribuée, et qui sont utilisées dans l'industrie. Ce conseil de prudence ne doit toutefois pas être utilisé si la phrase S 36 a été attribuée,
 - recommandé pour les substances et préparations toxiques auxquelles la phrase R 24 a été attribuée, ainsi que pour les substances et préparations corrosives qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S 28 Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec ... (produits appropriés à indiquer par le fabricant)

- Applicabilité:
 - substances et préparations très toxiques, toxiques ou corrosives.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations très toxiques,
 - recommandé pour les autres substances et préparations précitées, en particulier lorsque l'eau ne constitue pas le liquide de rinçage le plus indiqué,
 - recommandé pour les substances et préparations corrosives qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S 29 Ne pas jeter les résidus à l'égout

- Applicabilité:
 - liquides extrêmement ou facilement inflammables non miscibles avec l'eau,
 - substances et préparations très toxiques et toxiques,
 - substances dangereuses pour l'environnement.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances dangereuses pour l'environnement et portant le symbole "N" qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public, sauf si c'est l'utilisation prévue,
 - recommandé pour les autres substances et préparations précitées qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public sauf si c'est l'utilisation prévue.

S 30 Ne jamais verser de l'eau dans le produit

- Applicabilité:
 - substances et préparations réagissant violemment avec l'eau.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement à des cas spéciaux (acide sulfurique, par exemple); peut être utilisé, le cas échéant, pour donner l'information la plus claire possible, que ce soit pour souligner la phrase R 14 ou comme alternative à cette même phrase R 14.

S 33 Éviter l'accumulation de charges électrostatiques

- Applicabilité:
 - substances et préparations extrêmement ou facilement inflammables.
- Critères d'utilisation:
 - recommandé pour les substances et préparations utilisées par l'industrie qui n'absorbent pas l'humidité; n'est pratiquement jamais utilisé pour les substances et préparations mises sur le marché à destination du grand public.

S 35 Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes les précautions d'usage

- Applicabilité:
 - toutes les substances et préparations dangereuses.
- Critères d'utilisation:
 - recommandé pour les substances et préparations lorsque des instructions spéciales sont nécessaires pour leur élimination correcte.

S 36 Porter un vêtement de protection approprié

- Applicabilité:
 - peroxydes organiques,
 - substances et préparations très toxiques, toxiques ou nocives,
 - substances et préparations corrosives.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations très toxiques et corrosives,
 - obligatoire pour les substances et préparations auxquelles la phrase R 21 ou R 24 a été attribuée,
 - obligatoire pour les substances cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction de la troisième catégorie, sauf si les effets se manifestent uniquement en cas d'inhalation de la substance ou préparation,
 - obligatoire pour les peroxydes organiques,
 - recommandé pour les substances et préparations toxiques lorsque la valeur DL₅₀ par voie cutanée est inconnue, mais que la substance ou préparation est susceptible d'être toxique par contact avec la peau,
 - recommandé pour les substances et préparations utilisées dans l'industrie et qui sont susceptibles d'être nuisibles à la santé en cas d'exposition prolongée.

S 37 Porter des gants appropriés

- Applicabilité:
 - substances et préparations très toxiques, toxiques, nocives ou corrosives,
 - peroxydes organiques,
 - substances et préparations irritantes pour la peau, ou provoquant une sensibilisation par contact cutané.

- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations très toxiques et corrosives,
 - obligatoire pour les substances et préparations auxquelles la phrase R 21, R 24 ou R 43 a été attribuée,
 - obligatoire pour les substances cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction de la troisième catégorie sauf si les effets se manifestent uniquement en cas d'inhalation de la substance ou de la préparation,
 - obligatoire pour les peroxydes organiques,
 - recommandé pour les substances et les préparations toxiques, lorsque la valeur DL₅₀ par voie cutanée est inconnue mais que la substance ou préparation est susceptible d'être toxique par contact avec la peau,
 - recommandé pour les substances et préparations irritantes pour la peau.

S 38 En cas de ventilation insuffisante, porter un appareil respiratoire approprié

- Applicabilité:
 - substances et préparations très toxiques ou toxiques.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement aux cas spéciaux où des substances et préparations très toxiques ou toxiques sont utilisées dans l'industrie ou l'agriculture.

S 39 Porter un appareil de protection des yeux/du visage

- Applicabilité:
 - peroxydes organiques,
 - substances et préparations corrosives y compris les irritants susceptibles de provoquer de graves lésions oculaires,
 - substances et préparations très toxiques ou toxiques.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations auxquelles la phrase R 34, R 35 ou R 41 a été attribuée,
 - obligatoire pour les peroxydes organiques,
 - recommandé quand il est nécessaire d'attirer l'attention de l'utilisateur sur les risques qu'entraîne un contact avec les yeux, non mentionnés dans les phrases de risque qui doivent être attribuées à ces substances,
 - limité normalement aux cas exceptionnels où sont utilisées des substances et préparations très toxiques et toxiques, lorsqu'il peut y avoir des éclaboussures et que ces substances et préparations sont susceptibles d'être facilement absorbées par la peau.

S 40 Pour nettoyer le sol ou les objets souillés par ce produit, utiliser ... (à préciser par le fabricant)

- Applicabilité:
 - toutes les substances et préparations dangereuses.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement aux substances et préparations dangereuses pour lesquelles l'eau n'est pas considérée comme un agent nettoyant adéquat (lorsqu'il faut recourir à l'absorption par un matériau pulvérulent, à une dissolution par un solvant, etc.) et au cas où il est important, pour des raisons sanitaires ou pour des raisons de sécurité, de faire figurer un avertissement sur l'étiquette.

S 41 En cas d'incendie et/ou d'explosion, ne pas respirer les fumées

- Applicabilité:
 - substances et préparations dangereuses dont la combustion donne lieu à des dégagements de gaz très toxiques ou toxiques.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement à des cas spéciaux.

S 42 Pendant les fumigations/pulvérisations, porter un appareil respiratoire approprié [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant]

- Applicabilité:
 - substances et préparations destinées à cet usage, mais susceptibles de compromettre la santé et la sécurité de l'utilisateur si des mesures de précaution ne sont pas prises.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement à des cas spéciaux.

S 43 En cas d'incendie, utiliser ... (moyens d'extinction à préciser par le fabricant; si l'eau augmente les risques, ajouter: "Ne jamais utiliser d'eau")

- Applicabilité:
 - substances et préparations extrêmement inflammables, facilement inflammables et inflammables.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations qui, en contact avec l'eau ou avec l'air humide, donnent lieu à des dégagements de gaz extrêmement inflammables,
 - recommandé pour les substances et préparations extrêmement inflammables, facilement inflammables et inflammables, particulièrement lorsqu'elles ne se mélangent pas à l'eau.

S 45 En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)

- Applicabilité:
 - substances et préparations très toxiques,
 - substances et préparations toxiques et corrosives,
 - substances et préparations provoquant une sensibilisation par inhalation.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations précitées.

S 46 En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette

- Applicabilité:
 - toutes les substances et préparations dangereuses autres que celles qui sont très toxiques, toxiques, corrosives ou dangereuses pour l'environnement.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour toutes les substances et préparations dangereuses précitées susceptibles d'être utilisées par le grand public, sauf si l'ingestion de ces produits, particulièrement par des enfants, peut être considérée comme inoffensive.

S 47 Conserver à une température ne dépassant pas ... °C (à préciser par le fabricant)

- Applicabilité:
 - substances et préparations devenant instables à une certaine température.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement à des cas spéciaux (certains peroxydes organiques, par exemple).

S 48 Maintenir humide avec ... (moyen approprié à préciser par le fabricant)

- Applicabilité:
 - substances et préparations pouvant devenir très sensibles aux étincelles, au frottement ou au choc si on les laisse se dessécher.
- Critères d'utilisation:
 - limité normalement à des cas spéciaux, tels que les nitrocelluloses.

S 49 Conserver uniquement dans le récipient d'origine

- Applicabilité:
 - substances et préparations sensibles à la décomposition catalytique.
- Critères d'utilisation:
 - substances et préparations sensibles à la décomposition catalytique (par exemple certain peroxydes organiques).

S 50 Ne pas mélanger avec ... (à spécifier par le fabricant)

- Applicabilité:
 - substances et préparations pouvant réagir avec le produit spécifié et donner lieu à des dégagements de gaz très toxiques ou toxiques,
 - peroxydes organiques.
- Critères d'utilisation:
 - recommandé pour les substances et préparations précitées susceptibles d'être utilisées par le grand public, lorsque cette mention est préférable aux phrases R 31 ou R 32,
 - obligatoire avec certains peroxydes pouvant donner lieu à des réactions violentes en présence d'accélérateurs ou de promoteurs.

S 51 Utiliser seulement dans des zones bien ventilées

- Applicabilité:
 - substances et préparations pouvant ou devant donner lieu à des dégagements de vapeurs, de poussières, d'aérosols, de fumées, de brouillards, etc., faisant courir des risques par inhalation ou des risques d'incendie ou d'explosion.
- Critères d'utilisation:
 - recommandé lorsque la phrase R 38 n'est pas indiquée. L'emploi de cette mention est donc important lorsque de telles substances et préparations sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S 52 Ne pas utiliser sur des grandes surfaces dans les locaux habités

- Applicabilité:
 - substances volatiles très toxiques, toxiques et nocives et préparations les contenant.
- Critères d'utilisation:
 - recommandé lorsque la santé peut être affectée par une exposition prolongée à ces substances à cause de leur volatilisation à partir de grandes surfaces traitées dans les logements ou autres endroits clos où des personnes se réunissent.

S 53 Éviter l'exposition — Se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation

- Applicabilité:
 - substances et préparations cancérogènes, mutagènes et/ou toxiques pour la reproduction.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations précitées auxquelles a été attribuée au moins une des phrases R suivantes: R 45, R 46, R 49, R 60 ou R 61.

S 56 Éliminer ce produit et son récipient dans un centre de collecte des déchets dangereux ou spéciaux

- Applicabilité:
 - toutes les substances et préparations dangereuses.
- Critères d'utilisation:
 - recommandé pour toutes les substances et préparations dangereuses susceptibles d'être utilisées par le grand public, et pour lesquelles une élimination spéciale est requise.

S 57 Utiliser un récipient approprié pour éviter toute contamination du milieu ambiant

- Applicabilité:
 - substances auxquelles a été attribué le symbole "N".
- Critères d'utilisation:
 - normalement limité aux substances qui ne sont pas susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S 59 Consulter le fabricant/fournisseur pour les informations relatives à la récupération/au recyclage

- Applicabilité:
 - toutes les substances et préparations dangereuses.
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances dangereuses pour la couche d'ozone,
 - recommandé pour les autres substances et préparations pour lesquelles la récupération/le recyclage sont recommandés.

S 60 Éliminer le produit et/ou son récipient comme un déchet dangereux

- Applicabilité:
 - toutes les substances et préparations dangereuses.
- Critères d'utilisation:
 - recommandé pour les substances et préparations non susceptibles d'être utilisées par le grand public, lorsque la phrase S 35 n'a pas été attribuée.

S 61 Éviter le rejet dans l'environnement; consulter les instructions spéciales/la fiche de données de sécurité

- Applicabilité:
 - substances dangereuses pour l'environnement.
- Critères d'utilisation:
 - normalement utilisé pour les substances auxquelles a été attribué le symbole "N",
 - recommandé pour toutes les substances classées comme dangereuses pour l'environnement non visées ci-dessus.

S 62 En cas d'ingestion, ne pas faire vomir; consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette

- Applicabilité:
 - substances et préparations classées nocives avec la phrase R 65 conformément aux critères énoncés au point 3.2.3,
 - non applicable aux substances et préparations placées sur le marché sous forme d'aérosols ou dans des récipients munis d'un dispositif scellé de pluvérisation (voir points 8 et 9).
- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations précitées si elles sont vendues au grand public ou susceptibles d'être utilisées par celui-ci, sauf si les phrases S 45 ou S 46 sont obligatoires,
 - recommandé pour les substances et préparations précitées utilisées dans l'industrie, sauf si les phrases S 45 ou S 46 sont obligatoires.

S 63 En cas d'accident par inhalation, transporter la victime hors de la zone contaminée et la garder au repos

- Applicabilité:
 - substances et préparations très toxiques et toxiques (gaz, vapeurs, particules, liquides volatils),
 - substances et préparations provoquant une sensibilisation respiratoire.

- Critères d'utilisation:
 - obligatoire pour les substances et préparations auxquelles les phrases R 26, R 23 ou R 42 ont été attribuées et qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public dans des conditions où il y aurait risque d'inhalation.

S 64 En cas d'ingestion, rincer la bouche avec de l'eau (seulement si la personne est consciente)

- Applicabilité:
 - substances et préparations corrosives ou irritantes.
- Critères d'utilisation:
 - recommandé pour les substances et préparations précitées susceptibles d'être utilisées par le grand public, et si le traitement indiqué ci-dessus est adapté.

7.5.2. *Sélection des conseils de prudence*

Le choix final des conseils de prudence (phrases S) doit tenir compte des phrases de risque (phrases R) indiquées sur l'étiquette et de l'utilisation prévue de la substance ou de la préparation:

- en règle générale, un maximum de quatre phrases S suffira à formuler le conseil de prudence le plus adéquat; à cette fin, les phrases combinées inventoriées à l'annexe IV sont considérées comme des phrases uniques,
- dans le cas des phrases S concernant l'élimination, une seule phrase S doit être utilisée sauf s'il est évident que l'élimination du produit et de son récipient ne présente aucun danger pour la santé humaine ou l'environnement. En particulier, les conseils relatifs à une élimination en toute sécurité sont importants pour les substances et préparations vendues au grand public,
- certaines phrases R deviennent superflues si l'on opère un choix judicieux de phrases S et inversement; les phrases S donnant des conseils manifestement en rapport avec les phrases R seront reproduites sur l'étiquette uniquement s'il s'agit de mettre particulièrement l'accent sur un avertissement spécifique,
- dans le choix des phrases S, on accordera une attention toute spéciale aux conditions prévues d'utilisation de certaines substances et préparations, par exemple la pulvérisation ou tous autres effets d'aérosols. Les phrases doivent être sélectionnées en fonction de l'utilisation prévue,
- les conseils de prudence S 1, S 2 et S 45 sont obligatoires pour toutes les substances et préparations très toxiques, toxiques et corrosives vendues au grand public,
- les conseils de prudence S 2 et S 46 sont obligatoires pour toutes les autres substances et préparations dangereuses (à l'exception de celles classées seulement comme dangereuses pour l'environnement) et vendues au grand public.

Si les phrases sélectionnées dans le respect strict des critères énoncés au point 6.2 sont redondantes ou ambiguës, ou si à l'évidence, elles ne sont pas nécessaires dans le cas d'ensembles produit/emballage particuliers, certaines phrases peuvent être supprimées.

8. CAS PARTICULIERS: Substances

8.1. **Bouteilles de gaz transportables**

Pour les bouteilles de gaz transportables, on considère que les prescriptions relatives à l'étiquetage sont respectées lorsqu'elles sont conformes à l'article 23 ou à l'article 24, paragraphe 6, point b).

Toutefois, par dérogation à l'article 24, paragraphes 1 et 2, pour les bouteilles de gaz ayant une capacité en eau inférieure ou égale à 150 litres, il est possible d'utiliser une des alternatives suivantes:

- le format et les dimensions de l'étiquette peuvent respecter les prescriptions de la norme ISDO/DP 7225,
- les informations visées à l'article 23, paragraphe 2, peuvent être fournies sur un disque ou une étiquette durable, solidement fixé sur la bouteille.

8.2. Récipients de gaz destinés au propane, au butane ou au gaz de pétrole liquéfié (GPL)

Ces substances sont classées à l'annexe I. Bien que leur classification soit conforme à l'article 2, elles ne présentent pas de danger pour la santé humaine lorsqu'elles sont placées sur le marché, comme gaz combustibles libérés uniquement en vue de leur combustion, dans des bouteilles fermées rechargées ou dans des cartouches non rechargeables couvertes par la norme EN 417.

Ces bouteilles et ces cartouches doivent être étiquetées avec le symbole approprié et les phrases R et S concernant l'inflammabilité. Il n'est pas requis d'indiquer sur l'étiquette les informations concernant les effets sur la santé humaine. Cependant ces informations qui auraient dû apparaître sur l'étiquette seront transmises à l'utilisateur professionnel par la personne responsable de la mise sur le marché de la substance, sous la forme prévue à l'article 27 de la directive. En ce qui concerne les consommateurs, il leur sera transmis suffisamment d'informations pour leur permettre de prendre toutes les mesures nécessaires pour la santé et la sécurité, comme il est prévu à l'article 1^{er}, paragraphe 3, de la directive 91/155/CEE, modifiée par la directive 93/112/CEE.

8.3. Métaux sous forme massive

Ces substances sont classées à l'annexe I ou doivent être classées conformément à l'article 6. Bien que classées conformément à l'article 2, certaines de ces substances ne présentent pas, sous leur forme commercialisée, de danger pour la santé humaine en cas d'inhalation, d'ingestion ou de contact avec la peau, ni pour l'environnement aquatique. Ces substances ne requièrent pas d'étiquette en vertu de l'article 23. Cependant, toutes les informations qui auraient dû figurer sur l'étiquette devront être communiquées à l'utilisateur par la personne responsable de la mise sur le marché du métal, sous une forme prévue à l'article 27.

8.4. Substances classées avec la phrase R 65

Pour les substances classées nocives en raison du danger en cas d'aspiration, il n'est pas nécessaire de les étiqueter «nocif» avec la phrase R 65 si elles sont placées sur le marché sous forme d'aérosols ou dans des récipients munis d'un dispositif scellé de pulvérisation.
