

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

## **Essai de mutation réverse sur des bactéries**

### **INTRODUCTION**

1. Les essais bactériens de mutation réverse sont pratiqués sur des souches de *Salmonella typhimurium* et d'*Escherichia coli* auxotrophes à l'égard d'un acide aminé. Ils servent à détecter des mutations ponctuelles résultant de la substitution, de l'addition ou de la délétion d'une ou de quelques paires de bases de l'ADN (1)(2)(3). Le principe de ces essais bactériens de mutation réverse 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 indispensable. 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.

2. 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 supresseurs de tumeurs dans des cellules somatiques jouent un rôle dans le cancer, tant chez l'homme que dans des systèmes expérimentaux. Les essais bactériens de mutation réverse sont rapides, peu coûteux et relativement faciles à effectuer. Parmi les souches d'essai, beaucoup ont des propriétés qui facilitent la détection des mutations, notamment des séquences d'ADN sensibles sur les sites de réversion, des modifications qui accroissent la perméabilité des cellules aux grosses molécules et l'élimination des systèmes de réparation de l'ADN ou la stimulation de processus de réparation de l'ADN sujets à erreur. La spécificité des souches d'essai peut fournir des informations utiles sur les types de mutations induites par les agents actifs. 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.

3. Les définitions employées figurent en annexe.

### **CONSIDERATIONS INITIALES**

4. Les essais bactériens de mutation réverse utilisent des cellules procaryotes qui diffèrent des cellules de mammifères, notamment du point de vue du transport, du métabolisme, de la structure des chromosomes et des processus de réparation de l'ADN. Les essais faits *in vitro* nécessitent généralement une activation métabolique exogène. Les systèmes *in vitro* d'activation métabolique ne peuvent pas reproduire avec précision le métabolisme des cellules de mammifère *in vivo*. Pour cette raison, les essais ne fournissent pas directement des informations sur le pouvoir mutagène et carcinogène d'une substance sur des mammifères.

5. Les essais de mutation réverse dans les bactériens sont couramment employés comme première étape dans la détection de l'activité mutagène en général et des mutations ponctuelles en

particulier. De nombreuses données démontrent que beaucoup de produits chimiques ayant un effet dans ces essais présentent aussi une activité mutagène dans d'autres systèmes. Certains agents mutagènes ne sont pas décelés par ces systèmes d'essai. Ces défaillances peuvent tenir à la nature particulière de l'effet détecté, ou à des différences sur le plan de l'activation métabolique ou de la biodisponibilité. D'un autre côté, les facteurs qui amplifient la sensibilité des systèmes de réversion peuvent conduire à une surestimation de l'activité mutagène.

6. Les tests de mutation réverse peuvent ne pas convenir pour l'évaluation de certaines classes de produits chimiques, par exemple les composés fortement bactéricides (certains antibiotiques, par exemple) et ceux dont on sait (ou on soupçonne) 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 mammifères peuvent s'avérer plus appropriés.

7. Quoique de nombreux composés qui donnent un résultat positif dans ces essais sont cancérigènes pour les mammifères, la corrélation est loin d'être parfaite. La corrélation dépend de la classe chimique et il existe des substances cancérigènes qui ne sont pas détectées par la mutation réverse sur bactéries parce qu'elles agissent par des mécanismes non génotoxiques ou par des mécanismes qui sont absents dans les cellules bactériennes.

### **PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI**

8. Les bactéries en suspension sont exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique exogène. Dans la méthode d'incorporation directe dans la boîte (méthode par étalement), les suspensions sont mélangées avec une couche d'agar de surface et déposées immédiatement sur un milieu minimum. Dans la méthode de pré-incubation, le mélange de traitement est incubé et ensuite mélangé avec une couche d'agar de surface avant d'être étalé sur un milieu minimum. 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.

9. Plusieurs méthodes permettant de réaliser l'essai de mutation réverse chez les bactéries ont été décrites. Parmi celles qui sont communément utilisées figurent la méthode par incorporation directe (1)(2)(3)(4), la méthode de la pré-incubation (2)(3)(5)(6)(7)(8), la méthode de la fluctuation (9)(10) et la méthode par suspension (11). Des modifications pour les essais de gaz ou de vapeurs ont été décrites (12).

10. Les modes opératoires décrits dans la présente ligne directrice font principalement appel aux méthodes d'incorporation directe et de pré-incubation. Chacune de ces méthodes peut être utilisée avec et sans activation métabolique. Pour certains composés, la méthode de la pré-incubation présente des avantages. Ces composés appartiennent à des classes de substances chimiques telles que nitrosamines aliphatiques à courtes chaînes, métaux bivalents, aldéhydes, colorants azoïques et composés diazoïques, alcaloïdes pyrrolizidiniques, composés allyliques et nitrés (3). Il est également reconnu que certaines classes de mutagènes ne sont pas toujours détectées par les méthodes usuelles d'incorporation directe ou de pré-incubation. Ces classes doivent être considérées comme des cas spéciaux et il est fortement recommandé d'utiliser d'autres méthodes pour les détecter. On a pu mettre en évidence les cas spéciaux suivants (avec des exemples de méthodes qui pourraient servir à leur détection) : les colorants azoïques et composés diazoïques (3)(5)(6)(13), les gaz et les produits chimiques volatils (12)(14)(15)(16), et les glycosides (17)(18). Toute déviation d'un mode opératoire couramment utilisé demande à être justifiée.

## DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

### Préparations

#### **Bactéries**

11. Il faut laisser 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 dans cet essai renferment une concentration élevée de bactéries viables. La concentration peut être déterminée soit sur la base de données historiques sur les courbes de croissance obtenues antérieurement avec des témoins ou, dans chaque essai, par un comptage des bactéries viables par la méthode par étalement.

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

13. Au moins cinq souches de bactéries doivent être employées. Celles-ci doivent inclure 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 comportent une paire de bases AT sur le site primaire de réversion. Pour ces raisons il est recommandé de mettre en oeuvre la combinaison suivante de souches :

1. *S. typhimurium* TA1535, et
2. *S. typhimurium* TA1537 ou TA97 ou TA97a, et
3. *S. typhimurium* TA98, et
4. *S. typhimurium* TA100, et
5. *E. coli* WP2 uvrA ou *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) ou *S. typhimurium* TA102.

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

14. La préparation et le stockage des cultures mères doivent s'effectuer suivant des méthodes reconnues. Pour chaque culture mère 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, notamment la présence ou l'absence de plasmides de résistance, s'il y a lieu [résistance à l'ampicilline dans les souches TA98, TA100 et TA97a ou TA97, WP2 uvrA et WP2 uvrA (pKM101) et résistance à l'ampicilline plus la tétracycline dans la souche TA102], et également la présence de mutations caractéristiques (à savoir la mutation rfa chez *S. typhimurium* d'après la sensibilité au violet de méthyle et la mutation uvrA chez *E. coli* ou uvrB chez *S. typhimurium* d'après la sensibilité aux UV) (2)(3). Les souches doivent également produire un nombre de colonies de révertants spontanés par boîte qui soit dans les limites prévues en fonction des séries d'essais témoins réalisés précédemment dans le laboratoire (contrôles historiques) et de préférence comparable aux valeurs citées dans la littérature.

#### **Milieu**

15. On utilise un milieu agar minimum approprié (composé par exemple de milieu minimum E de Vogel-Bonner et de glucose) et une surcouche d'agar renfermant de l'histidine et de la biotine ou du tryptophane et permettant quelques divisions de cellules (1)(2)(9).

### **Activation métabolique**

16. Les bactéries 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 communément utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteur, préparée à partir de foies de rongeurs traités avec des inducteurs enzymatiques comme Aroclor 1254 (1)(2) ou une combinaison de phénobarbitone et  $\beta$ -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 peut varier suivant la classe chimique de la substance qui est soumise à l'essai. Dans certains cas il peut y avoir un avantage à utiliser plusieurs concentrations de la fraction post-mitochondriale. S'agissant de composés azoïques et diazoïques, un système d'activation métabolique différent peut s'avérer plus approprié (6)(13).

### **Substance d'essai/ préparation**

17. Les substances solides à tester sont préparées dans un véhicule ou un solvant approprié, puis diluées avant d'être affectées au traitement des bactéries. Les substances liquides peuvent être ajoutées directement ou après dilution au système d'essai. Il faut utiliser des préparations fraîches sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

### **Conditions expérimentales**

#### **Solvant/véhicule**

18. Le solvant/véhicule choisi ne doit pas réagir 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 de référence 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 il faut utiliser des solvants organiques exempts d'eau.

#### **Concentrations d'exposition**

19. 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 oeuvre. Un essai préliminaire afin de déterminer la toxicité et les caractéristiques de solubilité peut être utile. La cytotoxicité peut être détectée par une réduction du nombre de révertants, par un éclaircissement ou une diminution du tapis bactérien ou par 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'oeil nu. Pour les substances d'essai solubles et non cytotoxiques on recommande une concentration maximale de 5 mg ou 5  $\mu$ l par boîte. Pour les substances d'essai non cytotoxiques qui sont insolubles à 5 mg ou 5  $\mu$ l par boîte, il faut inclure dans l'essai une (ou plusieurs) concentration(s) à laquelle (auxquelles) on observe de l'insolubilité. Pour les substances qui sont cytotoxiques à moins de 5 mg ou 5  $\mu$ l/boîte il faut inclure dans la série des concentrations utilisées une concentration à laquelle la cytotoxicité est manifeste. Le précipité ne doit pas interférer avec le comptage.

20. Dans un premier essai il faut tester au moins cinq concentrations différentes de la substance d'essai, susceptibles d'être analysées et situées à 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 l'écart entre les niveaux de doses testés.

21. S'agissant de substances d'essai contenant des quantités substantielles d'impuretés potentiellement mutagènes il faut envisager des essais au-delà des concentrations indiquées.

### Témoins

22. Des témoins, spécifiques de la souche, positifs et négatifs (solvant ou véhicule) doivent être inclus dans chaque essai. Les essais des témoins doivent être faits avec et sans système d'activation métabolique. S'agissant des témoins positifs, il faut utiliser une concentration permettant de démontrer la validité de l'essai.

23. Pour les tests comportant un système d'activation métabolique, le(s) témoin(s) positif(s) de référence doi(ven)t être choisi(s) en fonction du type de souche bactérienne utilisé. Les produits chimiques suivants, par exemple, peuvent convenir comme témoins positifs :

Substance chimique et n° CAS
Diméthyl-9,10 anthracène [n° CAS 781-43-1]
Diméthyl-7,12 benzanthracène [n° CAS 57-97-6]
Rouge du Congo [n° CAS 573-58-0] (pour le test de Prival)
Benzo[a]pyrène [n° CAS 50-32-8]
Cyclophosphamide [n° CAS 50-18-0] cyclophosphamide monohydratée [n° CAS 6055-19-2]
Amino-2 anthracène [n° CAS 613-13-8]

Cependant, 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 batch de S9 par un mutagène qui requiert une activation métabolique par des enzymes microsomiques, benzo[a]pyrène et diméthyl-benzanthracène par exemple.

24. Voici quelques exemples de témoins positifs spécifiques de souches, s'employant dans les essais réalisés sans activation métabolique :

Substance chimique et n° CAS	Souche
Azoture de sodium [n° CAS 26628-22-8]	pour TA1535 et TA100
Nitro-2 fluorène [n° CAS 607-57-8]	pour TA98
Amino-9-acridine [n° CAS 90-45-9] ou ICR191 [n° CAS 17070-45-0]	pour TA1537, TA97 et TA97a
Hydroperoxyde de cumène [n° CAS 80-15-9]	pour TA102
Mitomycine C [n° CAS 50-07-7]	pour WP2 <u>uvrA</u> et TA102
N-éthyl N-nitro N-nitrosoguanidine [n° CAS 70-25-7] ou Oxyde de nitro-4 quinoléine [n° CAS 56-57-5]	pour WP2, WP2 <u>uvrA</u> et WP2 <u>uvrA</u> (pKM101)
Furylfuramide (AF-2) [n° CAS 3688-53-7]	pour les souches contenant des plasmides

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

26. L'essai doit comporter des témoins négatifs sans substance d'essai et constitués uniquement du solvant ou du véhicule. Ceux-ci doivent être traités de la même façon que la substance d'essai. Il faut également adjoindre des témoins non traités, à moins que des essais témoins réalisés antérieurement démontrent que le solvant choisi n'a pas d'action délétère ou mutagène.

## **MODE OPERATOIRE**

### **Traitement avec la substance d'essai**

27. 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 d'agar de surcouche. Dans un essai avec activation métabolique, on mélange habituellement 0.5 ml du mélange d'activation métabolique contenant une quantité adéquate de fraction post-mitochondriale (de l'ordre de 5 à 30 pour cent v/v), les bactéries et la substance d'essai, ou une solution de celle-ci, avec 2.0 ml d'agar de surcouche. Le contenu de chaque tube est mélangé et versé sur la surface d'un milieu minimum constitué d'agar. On laisse la surcouche d'agar se solidifier avant incubation.

28. Dans la méthode de la pré-incubation (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, avant que l'on ajoute l'agar de surcouche et que l'on verse le tout sur la surface d'un milieu minimum constitué d'agar. On mélange généralement 0.05 ou 0.1 ml de la solution de la substance d'essai, 0.1 ml de bactéries et 0.5 ml de mélange S9 ou tampon stérile avec 2.0 ml d'agar de surcouche. Pendant la pré-incubation les tubes doivent être aérées par agitation.

29. Pour une estimation adéquate de la variation, les boîtes doivent être réalisées en trois exemplaires pour chaque niveau de dose. 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.

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

### **Incubation**

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

## **RESULTATS ET RAPPORT**

### **Traitement des résultats**

32. Les données doivent préciser le nombre de colonies révertantes par boîte. Le nombre de colonies révertantes dans les boîtes des témoins négatifs (témoin avec solvant et témoin non traité, le cas échéant) et positifs doit également être mentionné.

33. Le comptage de chaque boîte, le nombre moyen de colonies révertantes par boîte et l'écart-type doivent être rapportés pour la substance d'essai et pour les témoins positifs et négatifs (non traité et/ou solvant).

34. Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse positive claire. Les résultats ambigus doivent être clarifiés en effectuant d'autres essais, préférentiellement en utilisant des conditions expérimentales modifiées. Les résultats négatifs demandent à être confirmés au cas par cas. Si cela n'est pas jugé nécessaire, une justification pertinente doit être fournie. Pour les expériences de confirmation, 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'espacement des niveaux de doses, la méthode de traitement (étalement ou pré-incubation en milieu liquide) et les conditions d'activation métabolique.

### **Evaluation et interprétation des résultats**

35. Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement lié à la dose du nombre de révertants ou une augmentation reproductible du nombre de révertants 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 de décision.

36. Une substance d'essai dont les résultats ne répondent pas aux critères susmentionnés est considérée comme non mutagène dans cet essai.

37. La plupart des expériences donneront des réponses positives ou négatives claires. Dans des cas rares cependant, l'ensemble des données ne permettra pas de dégager un jugement catégorique de l'activité de la substance étudiée. Les résultats peuvent rester ambigus ou douteux indépendamment du nombre de répétitions de l'essai.

38. Des résultats positifs obtenus lors d'un essai bactérien de mutation réverse indiquent que la substance induit des mutations ponctuelles par substitutions de bases ou modifications 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.

### **Rapport d'essai**

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

Substance d'essai :

- données d'identification et n° CAS, s'il est connu ;
- état physique et degré de pureté ;
- propriétés physico-chimiques qui ont une importance pour l'exécution de l'essai ;
- stabilité de la substance si elle est connue.

Solvant/Véhicule :

- justification du choix du solvant ou véhicule ;
- solubilité et stabilité de la substance dans le solvant ou 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 µg/boîte) et justification du choix des doses et du nombre de boîtes par point d'essai ;
- 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 ;
- comptage de chaque 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 ou véhicule) et positifs obtenues au cours de l'essai, y compris, par exemple, les ordres de grandeur, les moyennes et les écarts types ;
- données concernant les témoins négatifs (solvant ou véhicule) et positifs obtenues antérieurement, y compris, par exemple, les ordres de grandeur, les moyennes et les écarts types.

## Discussion des résultats.

## Conclusion.

**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, 347-364.
- (2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 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, 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, 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, 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. (1990). Bacterial Mutation Assays. In : *Basic Mutagenicity Tests : UKEMS Part 1 Revised*. Ed. D.J. Kirkland Cambridge University Press, pp. 13-61.
- (8) Aeschbacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, 167-177.
- (9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutation Res.*, 38, 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, 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, 335-344.
- (13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified *Salmonella* Assay. *Mutation Res.*, 136, 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, 2-141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
- (16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/*Salmonella* Assay. *Environmental Mutagenesis*, 9, 421-441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. *Cancer Res.*, 39, 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, 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, 285-291.
- (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", Eds F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
- (21) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, 175-177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J., and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., 88, 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, 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.

ANNEXEDEFINITIONS

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

Les mutagènes qui provoquent la substitution de paires de bases 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 originelle ou sur un autre site du génome bactérien.

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