

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

### **Essai d'Aberration Chromosomique sur Moelle osseuse de Mammifères**

#### **INTRODUCTION**

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La Ligne directrice 475 originale a été adoptée en 1984. En 1997, elle a été remplacée par une version révisée sur la base des avancées scientifiques réalisées jusqu'alors. La présente version modifiée de la ligne directrice reflète les connaissances scientifiques acquises après plus de trente années d'expérience de cet essai et de l'interprétation des données. Elle s'inscrit dans une série de lignes directrices sur la toxicologie génétique. Un document contenant des éléments d'information concis sur les essais de toxicologie génétique ainsi qu'un aperçu des récents changements qui ont été apportés à ces Lignes directrices a été développé (1).

2. L'essai d'aberration chromosomique *in vivo* sur moelle osseuse de mammifères se prête particulièrement bien à l'évaluation de la génotoxicité car, malgré des variations entre les espèces, les facteurs du métabolisme *in vivo*, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN sont actifs et contribuent aux réponses. L'essai *in vivo* est également considéré comme utile pour explorer plus avant un effet génotoxique détecté dans un système *in vitro*.

3. L'essai d'aberration chromosomique *in vivo* est destiné à identifier les produits chimiques d'essai qui provoquent des aberrations chromosomiques structurales dans des cellules de moelle osseuse d'animaux, généralement des rongeurs (2) (3) (4) (5). Les aberrations structurales peuvent être de deux types : chromosomiques ou chromatidiques. Si la majorité des aberrations induites par des produits chimiques génotoxiques sont de type chromatidique, des aberrations chromosomiques se produisent aussi. Les lésions chromosomiques et les événements connexes sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et on a de bonnes raisons de penser que, lorsque ces lésions et événements connexes frappent des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, ils jouent un rôle dans le cancer chez l'homme et dans les systèmes expérimentaux. Il est possible que des cas de polyploïdie (y compris d'endoreduplication) surviennent dans les essais d'aberration chromosomique *in vivo*. Or, une augmentation de la polyploïdie n'est ni indicative en soi du signe d'un potentiel aneugène et peut simplement indiquer une perturbation du cycle cellulaire ou une cytotoxicité. Cet essai n'est pas conçu pour mesurer l'aneuploïdie. Pour détecter l'aneuploïdie, il est recommandé de réaliser un test du micronoyau *in vivo* sur érythrocytes de mammifère (Ligne directrice 474) ou un test du micronoyau *in vitro* sur cellules de mammifères (Ligne directrice 487).

4. Les définitions utilisées sont données à l'annexe 1.

#### **REMARQUES PRÉLIMINAIRES**

5. Les rongeurs sont couramment utilisés dans cet essai, mais dans certains cas, d'autres espèces peuvent convenir si cela est justifié sur le plan scientifique. Cet essai se pratique sur la moelle osseuse, qui est un tissu très vascularisé formé d'une population de cellules au cycle rapide et faciles à prélever et à traiter. L'utilisation d'une espèce autre que le rat ou la souris doit être scientifiquement justifiée dans le rapport. Si des animaux autres que des rongeurs sont utilisés, il est recommandé que la mesure des aberrations chromosomiques sur la moelle osseuse soit intégrée à un autre essai de toxicité pertinent.

6. Cet essai n'est pas pertinent s'il est prouvé que les substances chimiques d'essai, ou leurs métabolites, n'atteindront pas le tissu cible.

7. Avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on considérera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats dans cet objectif. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

## **PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI**

8. Les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine et sont euthanasiés au moment approprié après le traitement. Avant l'euthanasie, les animaux sont traités avec un inhibiteur du fuseau (par exemple la colchicine ou le Colcemid®). Ensuite, les préparations chromosomiques faites à partir de cellules de la moelle osseuse sont colorées et les cellules en métaphase sont examinées pour mettre en évidence les aberrations chromosomiques.

## **VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE**

### **Épreuves de compétence**

9. Afin d'établir qu'il possède une expérience suffisante pour mener à bien l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit démontrer sa capacité à reproduire les résultats attendus d'après les données publiées ((6), par exemple) concernant les fréquences d'aberrations chromosomiques, avec un minimum de deux substances chimiques témoins positifs (y compris des réponses faibles induites par des doses faibles de témoins positifs) tels que ceux énumérés au tableau 1 et avec des témoins de véhicule/solvant compatibles (voir paragraphe 22). Les doses utilisées dans le cadre de ces expériences doivent produire des augmentations reproductibles qui sont fonction de la dose administrée, et démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai sur le tissu en question (moelle osseuse); la méthode d'analyse retenue doit être celle qui sera employée par le laboratoire. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 10 à 14.

### **Données des témoins historiques**

10. Dans le cadre de la vérification des compétences, le laboratoire devra établir :

- une plage et une distribution des témoins positifs historiques, et
- une plage et une distribution des témoins négatifs historiques.

11. Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées, lorsqu'elles existent. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution. La base des données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit être statistiquement robuste pour permettre au laboratoire d'évaluer la distribution de ses données des témoins négatifs. La littérature suggère qu'un minimum de 10 expériences peut-être nécessaire, sachant qu'il serait préférable d'en compter au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Le laboratoire doit avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques (cartes C ou cartes X-barre, par exemple (7)), afin de déterminer la variabilité de ses données et de démontrer sa maîtrise de la méthodologie. On trouve dans la littérature (8) d'autres recommandations sur la façon de constituer et d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

12. Si, au cours des expériences visant à vérifier sa compétence (comme décrit au paragraphe 9), le laboratoire n'a pas réalisé un nombre suffisant d'expériences pour établir une distribution des témoins négatifs statistiquement robuste (voir paragraphe 11), on peut accepter que la distribution soit construite au cours des premiers tests de routine. Cette approche devra suivre les recommandations établies dans la littérature (8) et les résultats des témoins négatifs obtenus lors de ces expériences devront être cohérents avec les données publiées des témoins négatifs.

13. Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée à la lumière de ses répercussions sur la cohérence des nouvelles données avec celles de la base de données des témoins historiques. Seules des incohérences majeures justifient l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques, après confirmation de la différence de distribution des données par des experts (voir paragraphe 11). Lors de la constitution de cette nouvelle base de données, le laboratoire n'a pas forcément besoin d'une base de données de témoins négatifs complète pour autoriser la conduite d'un essai, à condition qu'il puisse apporter la preuve que les valeurs des témoins négatifs concomitants sont cohérentes avec la précédente base de données ou avec les données publiées correspondantes.

14. Les données des témoins négatifs désignent l'incidence des aberrations chromosomiques structurales (lacunes non comprises) chez chaque animal. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire. Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable, à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes, et qu'il soit prouvé que le système d'essai est « sous contrôle » (voir paragraphe 11) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou humaine.

## DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

### Préparations

#### *Choix des espèces animales*

15. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains issus de souches de laboratoire courantes. Les rats sont habituellement utilisés, mais les souris peuvent également convenir. Toute autre espèce

appropriée de mammifère peut être employée à condition qu'une justification scientifique de ce choix soit donnée dans le rapport.

#### *Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux*

16. Pour les rongeurs, la température de l'animalerie doit être maintenue à 22°C ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 40 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à volonté. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les rongeurs sont mis en cage par petits groupes d'individus de même sexe (cinq au maximum par cage) recevant le même traitement, si aucun comportement agressif n'est à craindre, de préférence dans des cages à fond plein dotées d'un enrichissement environnemental approprié. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié sur le plan scientifique.

#### *Préparation des animaux*

17. On choisit habituellement de jeunes animaux adultes sains (les rongeurs sont idéalement âgés de 6 à 10 semaines au début du traitement, bien que des animaux un peu plus âgés soient également acceptables), qui sont répartis de manière aléatoire entre les groupes témoins et les groupes de traitement. Chaque animal est identifié individuellement selon une méthode sans cruauté, la moins invasive possible (par exemple, baguage, étiquetage, pose d'une puce électronique ou identification biométrique, en évitant l'entaillage des oreilles ou la phalangectomie) et gardés dans leurs cages pendant au moins cinq jours afin qu'ils s'acclimatent aux conditions du laboratoire. Les cages doivent être placées de manière à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Il convient d'éviter toute contamination croisée entre le témoin positif et le produit chimique d'essai. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser  $\pm 20$  pour cent du poids moyen de chaque sexe.

#### *Préparation des doses*

18. Lorsque les produits chimiques testés sont solides, ils sont dissous ou mis en suspension dans des solvants ou des véhicules appropriés, ou incorporés aux aliments ou à l'eau de boisson avant d'être administrés aux animaux. Les produits chimiques liquides peuvent être administrés directement ou dilués avant d'être administrés. En cas d'exposition par inhalation, les produits chimiques d'essai peuvent être administrés sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol solide ou liquide, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. On utilisera des préparations fraîches, sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage et définissent les conditions de stockage appropriées.

#### *Solvant/véhicule :*

19. Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées ni interagir avec les produits chimiques d'essai. Le recours à des solvants/véhicules inhabituels doit être justifié par des données de référence faisant état de leur compatibilité. Il est recommandé d'envisager en premier lieu l'utilisation d'un solvant/véhicule aqueux chaque fois que c'est possible. Parmi les exemples de solvants/véhicules compatibles couramment utilisés figurent notamment l'eau, le sérum physiologique, les solutions de méthylcellulose, les solutions de carboxyméthylcellulose sodique, l'huile d'olive et l'huile de maïs. En l'absence de données historiques ou publiées montrant que le véhicule/solvant inhabituel sélectionné

n'induit aucune aberration structurale ou effet délétère, une étude initiale devra être réalisée afin d'établir l'acceptabilité du témoin de solvant/véhicule.

### Témoins

#### *Témoins positifs*

20. Chaque essai doit normalement inclure un groupe d'animaux traités avec une substance chimique utilisée comme témoin positif. Cette étape peut être évitée une fois que le laboratoire d'essai a apporté la preuve de ses compétences pour la conduite de l'essai et établi la plage des témoins positifs historiques. Lorsqu'aucun groupe témoin concomitant n'est utilisé simultanément, des témoins d'examen (lames fixes et non colorées) devront être inclus dans chaque expérience. Pour ce faire, on pourra intégrer à l'étape d'examen des échantillons de référence idoines obtenus et stockés lors d'un essai séparé sur témoin positif mené périodiquement (par exemple, tous les 6 à 18 mois) dans le laboratoire dans lequel l'essai est conduit, notamment au cours de l'épreuve de compétence et par la suite sur une base régulière, si nécessaire.

21. Les substances utilisées comme témoins positifs doivent produire, de façon fiable, un accroissement détectable de la fréquence des cellules présentant des aberrations chromosomiques par rapport au niveau spontané. Les doses des témoins positifs doivent être choisies de telle sorte que les effets soient nets mais que l'identité des lames codées ne soit pas évidente pour l'examineur. Il est possible d'administrer le témoin positif par une voie différente de celle du produit chimique d'essai, de suivre un autre programme de traitement et de n'effectuer qu'un seul prélèvement d'échantillon. De plus, l'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'il y a lieu. Des exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs figurent au tableau 1 ci-dessous.

**Tableau 1.** Exemples de substances chimiques utilisées comme témoins positifs.

<b>Substance chimique et n° CAS</b>
Méthanesulfonate d'éthyle [n° CAS 62-50-0]
Méthanesulfonate de méthyle [n° CAS 66-27-3]
Ethylnitrosourée [n° CAS 759-73-9]
Mitomycine C [n° CAS 50-07-7]
Cyclophosphamide (monohydratée) [n° CAS 50-18-0 ; (n° CAS 6055-19-2)]
Triéthylènemélamine [n° CAS 51-18-3]

*Témoins négatifs*

22. Pour chaque moment d'échantillonnage, il faut inclure un groupe d'animaux témoins négatifs, qui seront manipulés de la même façon que les groupes traités, mais ne recevront pas le produit chimique d'essai. Si un solvant/véhicule est utilisé pour administrer le produit chimique d'essai, ce solvant/véhicule doit être administré au groupe témoin. Toutefois, si des résultats obtenus antérieurement par le laboratoire d'essai démontrent que la variabilité interindividuelle et la fréquence des cellules comportant des aberrations chromosomiques provenant de témoins négatifs sont stables pour chaque moment d'échantillonnage, un seul prélèvement peut alors suffire pour les témoins négatifs. Dans ce cas, il doit intervenir au moment du premier prélèvement effectué dans le cadre de l'étude.

**MODE OPÉRATOIRE****Nombre et sexe des animaux**

23. En règle générale, la réponse des micronoyaux est similaire chez les animaux mâles et femelles (9), et il est à prévoir qu'il en sera de même pour les aberrations chromosomiques structurales ; la plupart des études pourrait donc être réalisée sur l'un ou l'autre des deux sexes. Des données démontrant des différences significatives entre les mâles et les femelles (par exemple sur le plan de la toxicité systémique, du métabolisme, de la biodisponibilité, de toxicité sur la moelle osseuse, etc comprenant également des données provenant par exemple d'études de détermination des doses) encouragent l'utilisation des deux sexes. Il peut donc être plus approprié dans ce cas de mener une étude sur les deux sexes, par exemple dans le cadre d'une étude de toxicité à doses répétées. Il pourrait être judicieux de recourir à un plan factoriel en cas d'utilisation des deux sexes. Des précisions sur cette méthode d'analyse des données sont fournies à l'annexe 2.

24. La taille des groupes au début de l'étude doit permettre de disposer dans chaque groupe d'au moins cinq animaux analysables du même sexe, ou de chaque sexe si les deux sont utilisés. Si l'exposition humaine est spécifique pour un sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, l'essai sera pratiqué sur des animaux du sexe approprié. À titre d'information concernant le nombre maximum d'animaux généralement requis, une étude sur moelle osseuse comptant deux moments d'échantillonnage et impliquant trois groupes de traitement et un groupe de témoins négatifs concomitants, plus un groupe de témoins positifs (chaque groupe étant composé de cinq animaux du même sexe) nécessitera 45 animaux.

**Niveaux de dose**

25. Si l'on procède à une étude préliminaire de détermination des doses à administrer parce qu'on ne dispose pas de données fiables pour orienter le choix des doses, cette étude préliminaire doit être effectuée dans le même laboratoire, en utilisant une espèce, une souche, un sexe et un régime de traitement identiques à ceux de l'étude principale (10). Elle devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose la plus élevée qui sera tolérée sans faire apparaître de toxicité limitante, dans le cadre de la durée de l'étude (par exemple, induisant une baisse du poids corporel ou une cytotoxicité du système hématopoïétique), mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant de sacrifier les animaux (11).

26. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme celle qui donne lieu à certains symptômes de toxicité pour la moelle osseuse.

27. Les substances chimiques dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées ou qui induisent un processus de détoxification pouvant se traduire par une baisse de l'exposition après une administration à long terme peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées au cas par cas.

28. Pour permettre d'obtenir des informations sur la relation dose-réponse, une étude complète doit comporter un groupe témoin négatif et au moins trois niveaux de doses, espacés en général d'un facteur de 2, mais pas de plus de 4. Si le produit chimique d'essai ne provoque aucune toxicité dans le cadre d'une étude de détermination des doses, ou d'après les données disponibles, la dose la plus élevée pour une administration unique doit être de 2 000 mg/kg de poids corporel. Néanmoins, si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, la dose administrée la plus élevée devra correspondre à la DMT et les niveaux de dose employés devront de préférence s'étendre de la dose maximale à une dose induisant peu ou pas de toxicité. Lorsqu'une toxicité sur le tissu cible (moelle osseuse) est observée à tous les niveaux de doses administrés, il est conseillé de procéder à des études complémentaires à des doses non toxiques. Les études visant à caractériser davantage les informations sur la relation quantitative dose-réponse peuvent nécessiter un ou plusieurs groupes de traitement supplémentaires. Enfin, ces limites peuvent varier pour certains types de produits chimiques d'essai (par exemple les produits pharmaceutiques à usage humain) faisant l'objet d'exigences spécifiques.

### Essai limite

29. Si les essais préliminaires de détermination des doses ou les données existantes concernant des souches de rongeurs apparentées indiquent qu'un régime de traitement égal ou supérieur à la dose limite (décrite ci-dessous) n'engendre pas d'effets toxiques observables (notamment aucune dépression de la fonction médullaire osseuse ni autre cytotoxicité pour le tissu cible), et si la génotoxicité n'est pas escomptée d'après des études de génotoxicité *in vitro* ou d'après les données relatives aux substances structurellement apparentées, une étude complète utilisant trois niveaux de doses peut ne pas être considérée comme nécessaire, à condition qu'il ait été démontré que le/les produit(s) chimiques d'essai atteignent le tissu cible (moelle osseuse). Dans ce cas, un seul niveau de dose, égal à la dose limite, peut s'avérer suffisant. Pour une période d'administration de plus de 14 jours, la dose limite est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour. Pour des périodes d'administration de 14 jours ou moins, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour.

### Administration des doses

30. Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, l'implantation ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse, orale (par gavage) et intra-trachéale sont autant de choix valables, sous réserve qu'ils soient justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du/des tissu(s) cible(s). L'injection intrapéritonéale n'est en général pas recommandée, car elle ne constitue pas une voie d'exposition humaine envisagée, et ne sera utilisée qu'en cas de justification scientifique spécifique. Si le produit chimique d'essai est mélangé à l'alimentation ou à l'eau de boisson, surtout dans le cas d'un dosage unique, il convient de s'assurer que le délai entre l'absorption de nourriture et d'eau et le prélèvement est suffisant pour permettre une détection des effets (voir paragraphes 33 et 34). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit normalement pas excéder 1 ml/100 g de poids corporel, sauf pour les solutions aqueuses, où un maximum de 2 ml/100 g est acceptable. L'utilisation de volumes plus importants doit être justifiée. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, afin de garantir l'administration d'un volume constant pour un poids corporel donné, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

### Programme de traitement

31. En règle générale, les produits chimiques d'essai sont administrés en une seule fois, mais si le volume est important, l'administration peut être fractionnée (à raison de deux traitements ou plus le même jour à intervalles de 2 à 3 heures maximum). En pareil cas, ou lors d'une administration du produit chimique d'essai par inhalation, le moment d'échantillonnage sera fixé en fonction du moment d'administration de la dernière fraction, ou de la fin de l'exposition.

32. On ne dispose guère de données sur la pertinence d'un protocole de doses répétées pour cet essai. Cependant, dans les cas où il est conseillé d'intégrer cet essai à un essai de toxicité à doses répétées, il faut prendre soin d'éviter la perte de cellules mitotiques présentant des lésions chromosomiques, un phénomène susceptible de se produire à des doses toxiques. Une telle intégration est acceptable lorsque la dose la plus élevée est supérieure ou égale à la dose limite (voir paragraphe 29) et que cette dose limite est administrée à un groupe de traitement pendant toute la durée du traitement. Il convient de considérer le test du micronoyau (Ligne directrice 474) comme le test *in vivo* de première intention pour la détection des aberrations chromosomiques lorsqu'une intégration à d'autres études est souhaitée.

33. Les échantillons de moelle osseuse doivent être prélevés à deux moments différents à la suite de chaque traitement. Pour les rongeurs, le premier intervalle de prélèvement se situe à 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire (généralement de 12 à 18 heures après le traitement). Étant donné que le temps requis par l'absorption et la métabolisation des produits chimiques d'essai ainsi que leur effet sur la cinétique du cycle cellulaire peuvent influencer sur le moment optimal pour la détection des aberrations chromosomiques, on recommande d'effectuer un autre prélèvement 24 heures après le premier. Au premier moment d'échantillonnage, tous les groupes de traitement doivent être traités et des échantillons collectés pour analyse ; cependant, lors du/des prélèvement(s) ultérieur(s), seule la dose la plus élevée doit être administrée. Si l'on applique des programmes de traitement qui couvrent plus d'une journée sur justification scientifique, l'échantillonnage devrait normalement intervenir à l'issue d'une période équivalente à environ 1.5 fois la durée normale du cycle cellulaire après la fin du traitement.

34. Après le traitement et avant le prélèvement des échantillons, les animaux reçoivent une dose appropriée d'un inhibiteur du fuseau (par exemple le Colcemid® ou la colchicine) par injection intrapéritonéale et les prélèvements sont ensuite effectués dans un délai approprié, qui est de 3 à 5 heures environ pour la souris et de 2 à 5 heures pour le rat. Les cellules sont prélevées dans la moelle osseuse, dilatées, fixées et colorées, puis analysées en vue de détecter des aberrations chromosomiques (12).

### **Observations**

35. Les animaux d'essai font l'objet d'un examen clinique général. Les signes cliniques doivent être consignés au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration. Au moins deux fois par jour pendant la durée du traitement, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Tous les animaux doivent être pesés au début de l'étude, au moins une fois par semaine au cours des études à doses répétées, puis lors de l'euthanasie. Pour les études dont la durée est égale ou supérieure à une semaine, la consommation de nourriture doit également être mesurée au moins une fois par semaine. Si le produit chimique testé est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai (11).

### **Exposition du tissu cible**

36. Lorsque cela se justifie et qu'il n'existe pas d'autres données sur l'exposition (voir paragraphe 44), il convient de réaliser un prélèvement sanguin au(x) moment(s) idoine(s) pour vérifier la concentration des produits chimiques d'essai dans le plasma afin de démontrer que la moelle osseuse a bien été exposée.

### **Préparation de la moelle osseuse et des chromosomes**

37. Les cellules de moelle osseuse sont obtenues à partir des fémurs ou des tibias des animaux immédiatement après l'euthanasie, exposées à une solution hypotonique et fixées. Les cellules en métaphase sont ensuite étalées sur des lames et colorées selon des méthodes éprouvées (voir (3) (12)).

### **Analyse**

38. Toutes les lames, y compris celles des témoins positifs et négatifs, doivent être codées individuellement avant l'analyse et randomisées afin que l'analyste ignore à quel traitement elles correspondent.

39. L'indice mitotique sert de mesure de la cytotoxicité et doit être déterminé dans un minimum de 1 000 cellules pour tous les animaux traités (témoins positifs compris) et les animaux non traités ou témoins de véhicule/solvant.

40. Un minimum de 200 métaphases par animal doit être analysé pour détecter les aberrations chromosomiques, lacunes comprises et non comprises (6). Cependant, si la base de données des témoins négatifs historiques indique une fréquence de fond moyenne des aberrations chromosomiques structurales < 1 % dans le laboratoire, il convient d'envisager l'examen de cellules supplémentaires. Les aberrations de type chromatidique et chromosomique doivent être consignées séparément et classées par sous-types (cassures, échanges). Les procédures en cours dans le laboratoire doivent assurer que l'analyse des aberrations chromosomiques est réalisée par des examinateurs qualifiés, sous le contrôle de pairs si nécessaire. Étant donné que les procédures de préparation des lames provoquent 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 ou supérieur à  $2n \pm 2$ ,  $n$  étant le nombre haploïde de chromosomes pour cette espèce.

## RÉSULTATS ET RAPPORT

### Traitement des résultats

41. Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'indice mitotique, le nombre de cellules en métaphase examinées, le nombre d'aberrations par cellule en métaphase ainsi que le pourcentage de cellules présentant une/des aberration(s) chromosomique(s) structurale(s) doivent être indiqués pour chaque animal. Les différents types d'aberrations chromosomiques structurales doivent être consignés avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes de traitement et témoins. Les lacunes, ainsi que les cellules polyploïdes et présentant des chromosomes endoredupliqués sont notées séparément. La fréquence des lacunes est rapportée mais n'est généralement pas incluse dans l'analyse de 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. Les données relatives à la toxicité pour l'animal et aux signes cliniques doivent elles aussi figurer dans le rapport.

### Critères d'acceptabilité

42. Les critères suivants déterminent l'acceptabilité de l'essai :

- a) Les données relatives aux essais témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins historiques du laboratoire (voir paragraphes 11 à 14) ;
- b) Les témoins positifs ou témoins d'examen concomitants doivent induire des réponses compatibles avec celles générées par les témoins positifs figurant dans la base de données historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (voir paragraphes 20 - 21) ;
- c) Le nombre idoine de doses et de cellules est analysé ;
- d) Les critères de sélection de la dose la plus élevée sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 25 à 28.

**Évaluation et interprétation des résultats**

43. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si :

- a) au moins un des groupes de traitement présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence des cellules présentant des aberrations chromosomiques structurales (lacunes non comprises) par rapport aux témoins négatifs concomitants,
- b) un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose pour au moins l'un des moments d'échantillonnage,
- c) les résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson).

Si seule la dose la plus élevée est étudiée à un moment d'échantillonnage particulier, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si on constate une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants et que les résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson). Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (13). Une analyse de la relation dose-réponse doit porter sur un minimum de trois groupes de traitement. Les méthodes statistiques doivent utiliser l'animal comme unité expérimentale. Des résultats positifs obtenus dans un essai d'aberration chromosomique indiquent qu'un produit chimique d'essai induit des aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de l'espèce testée.

44. À condition que tous les critères d'acceptabilité soient remplis, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement négatif si, dans toutes les conditions expérimentales étudiées :

- a) aucun des groupes de traitement ne présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence des cellules présentant des aberrations chromosomiques structurales (lacunes non comprises) par rapport aux témoins négatifs concomitants,
- b) un test de tendance approprié montre qu'à aucun des moments d'échantillonnage, il n'y a d'augmentation liée à la dose,
- c) l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson) et,
- d) il y a bien eu exposition de la moelle osseuse à la / aux substance(s) chimique(s) d'essai.

Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (13). L'exposition de la moelle osseuse à une substance chimique d'essai peut être démontrée par une baisse de l'indice mitotique ou par la mesure de la concentration de la/des substance(s) chimique(s) d'essai dans le plasma ou le sang. \*Pour démontrer l'exposition de la moelle osseuse, on peut également avoir recours aux données ADME, obtenues dans le cadre d'une étude indépendante employant la même voie d'administration et la même espèce. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, le produit chimique d'essai n'induit pas d'aberrations chromosomiques structurales dans la moelle osseuse de l'espèce testée. (\*Dans le cas d'une administration par voie intraveineuse, des preuves de l'exposition ne sont pas requises.)

45. Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse positive claire ou négative claire.

46. Lorsque la réponse n'est ni clairement négative ni clairement positive, et afin d'établir la signification biologique d'un résultat (par exemple, une augmentation faible ou marginale), les données doivent être soumises à un jugement d'experts et/ou des investigations plus poussées sur les expériences déjà réalisées. Dans certains cas, il peut être utile d'examiner des cellules supplémentaires ou de répéter l'expérience en modifiant les conditions expérimentales.

47. Dans de rares cas, même après des investigations complémentaires, les données ne permettront pas de conclure que le produit chimique d'essai provoque des résultats clairement positifs ou négatifs. Les résultats de l'étude seront alors considérés comme équivoques.

48. La fréquence de métaphases polyploïdes et endoredupliquées par rapport au nombre total de métaphases doit être consignée séparément. Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes/endoredupliquées peut signifier que la substance d'essai est capable d'inhiber les processus mitotiques ou la progression du cycle cellulaire (voir paragraphe 3).

### Rapport d'essai

49. Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes :

#### *Résumé*

#### *Produit chimique d'essai :*

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation si c'est disponible ;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue.

#### Substance mono-constituant :

- apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude ;
- identification chimique : nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

#### Substance multi-constituants, UVCB et mélanges :

- caractérisés autant que possible par l'identité chimique des constituants (voir ci-dessus), la présence, la quantité et les propriétés physico-chimiques des constituants.

#### *Préparation du produit chimique d'essai :*

- justification du choix du véhicule ;
- solubilité et stabilité du produit chimique testé dans le solvant/véhicule, si elles sont connues ;
- préparation des formulations à administrer dans l'alimentation, l'eau de boisson ou par inhalation ;
- déterminations analytiques sur les formulations (stabilité, homogénéité, concentrations nominales, par exemple), lorsqu'elles ont été réalisées.

#### *Animaux d'essai :*

- espèces/souches utilisées et justification ;
- nombre, âge et sexe des animaux ;

- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc. ;
- méthode d'identification individuelle des animaux ;
- pour les études de courte durée : poids individuel des animaux au début et à la fin de l'essai ; pour les études d'une durée supérieure à une semaine : poids individuel des animaux et consommation de nourriture. La plage des poids corporels, ainsi que la moyenne et l'écart type pour chaque groupe doivent également être mentionnés.

*Conditions expérimentales :*

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule) ;
- données issues de l'étude de détermination des doses, si elle a été réalisée ;
- justification du choix des doses ;
- détails sur la préparation du produit chimique d'essai ;
- détails sur l'administration du produit chimique d'essai ;
- justification de la voie et de la durée d'administration ;
- méthodes utilisées pour vérifier que la/les substance(s) chimique(s) d'essai a/ont atteint la circulation générale ou la moelle osseuse ;
- dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration (ppm) du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson, et de la consommation, s'il y a lieu ;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau ;
- méthode d'euthanasie ;
- méthode d'analgésie (le cas échéant) ;
- description détaillée des calendriers de traitement et d'échantillonnage et justification des choix ;
- méthodes de préparation des lames ;
- méthodes d'évaluation de la toxicité ;
- nature et concentration du produit chimique utilisé pour bloquer la métaphase, dose et heure d'administration avant le prélèvement ;
- procédures d'isolement et de conservation des échantillons ;
- critères d'analyse des aberrations ;
- nombre de cellules en métaphase analysées par animal et nombre de cellules analysées pour déterminer l'indice mitotique ;
- critères d'acceptabilité de l'étude ;
- critères permettant de conclure que les résultats de l'étude sont positifs, négatifs ou équivoques.

*Résultats :*

- état de santé des animaux avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité ;
- indice mitotique, donné séparément pour chaque animal ;
- type et nombre d'aberrations et de cellules aberrantes, donnés séparément pour chaque animal ;
- nombre total d'aberrations par groupe, moyenne et écart-type ;
- nombre de cellules présentant des aberrations par groupe, moyenne et écart-type ;
- modifications de la ploïdie, le cas échéant, y compris les fréquences de polyploïdes et/ou de cellules endoredupliquées ;
- relation dose-réponse, si possible ;

- analyses et méthodes statistiques employées ;
- données mettant en évidence une exposition de la moelle osseuse ;
- données relatives aux témoins négatifs et positifs concomitants, y compris les plages, moyennes et écarts-types ;
- données relatives aux témoins négatifs et positifs historiques, y compris les plages, moyennes, écarts-types, limites de contrôle à 95 % pour la distribution, ainsi que période couverte et nombre d'observations ;
- critères remplis pour une réponse positive ou négative.

*Discussion des résultats.*

*Conclusions.*

*Références.*

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations No. 234, OCDE, Paris.
- (2) Adler, I.D. (1984), "Cytogenetic Tests in Mammals", in *Mutagenicity Testing: A Practical Approach*, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.
- (3) Preston, R.J. et al. (1987), Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, *Mutation Research*, Vol. 189/2, pp. 157-165.
- (4) Richold, M. et al. (1990), "In Vivo Cytogenetics Assays", in *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
- (5) Tice, R.R. et al. (1994), Report from the working group on the in vivo mammalian bone marrow chromosomal aberration test, *Mutation Research*, Vol. 312/3, pp. 305-312.
- (6) Adler, I.D. et al. (1998), Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 417/1, pp. 19-30.
- (7) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (8) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (9) Hayashi, M. et al. (1994), In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293-304.
- (10) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313-319.
- (11) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.
- (12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1044, pp. 147-163.
- (13) Lovell, D.P. et al. (1989), "Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays", in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

## ANNEXE 1

## DÉFINITIONS

Aberration chromosomique structurale : modification de la structure des chromosomes, détectable par un examen au microscope des cellules au stade de la métaphase et apparaissant sous la forme de délétions, fragmentations et modifications intrachromosomiques ou interchromosomiques.

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

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

Aberration numérique : modification du nombre de chromosomes par rapport au nombre normal caractéristique des animaux employés (aneuploïdie).

Aneuploïdie : tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes, d'un seul ou de plusieurs chromosomes, mais non de multiples d'un ou de plusieurs jeux de chromosomes (*cf.* polyploïdie).

Centromère : régions d'un chromosome auxquelles les fibrilles du fuseau sont associées pendant la division de la cellule et qui permettent le mouvement ordonné des chromosomes-filles vers les pôles des cellules-filles.

Endoreduplication : processus par lequel le noyau, après une période S de réplication de l'ADN, n'entre pas en mitose mais recommence une nouvelle période S. Il en résulte des chromosomes comptant 4, 8, 16,... chromatides.

Indice mitotique : ratio entre le nombre de cellules en mitose et le nombre total de cellules dans une population, donnant une mesure de la vitesse de prolifération de cette population de cellules.

Lacune : lésion achromatique inférieure à la largeur d'une chromatide, marquée par un défaut d'alignement minime des chromatides.

Polyploïdie : aberration chromosomique numérique se traduisant par une modification du nombre de jeux de chromosomes, et non par une modification numérique touchant une partie du jeu de chromosomes (*cf.* aneuploïdie).

## ANNEXE 2

**PLAN FACTORIEL UTILISÉ POUR IDENTIFIER LES DIFFÉRENCES ENTRE SEXES DANS L'ESSAI D'ABERRATION CHROMOSOMIQUE *IN VIVO****Plan factoriel et analyse factorielle*

Selon cette démarche, un minimum de 5 mâles et de 5 femelles sont exposés à chaque concentration d'essai, ce qui conduit à utiliser un minimum de 40 animaux (20 mâles et 20 femelles, auxquels s'ajoutent les témoins positifs nécessaires).

La démarche décrite ici, qui correspond à l'une des formes simples du plan factoriel, équivaut à une analyse de variance à deux facteurs, dans laquelle le sexe et la concentration sont les facteurs principaux. Les données peuvent être analysées à l'aide de nombreux progiciels statistiques standard tels que SPSS, SAS, STATA ou Genstat, ou en utilisant le logiciel R.

À partir de l'ensemble de données, on détermine la variabilité entre les sexes, la variabilité entre les concentrations et la variabilité liée à l'interaction entre sexe et concentrations. Chacun de ces termes est comparé à une estimation de la variabilité entre les animaux répartis au sein des groupes d'animaux de même sexe exposés à la même concentration. On trouvera plus de précisions sur cette méthode dans les manuels de statistiques classiques (voir les références) et dans les fichiers d'aide fournis avec les logiciels statistiques.

On examine ensuite le terme d'interaction sexe x concentration dans un tableau ANOVA<sup>1</sup>. En l'absence de terme d'interaction significatif, la combinaison des valeurs inter-sexes ou inter-niveaux de concentration permet de réaliser des tests statistiques valides entre les niveaux, en se basant sur le terme de variabilité intra-groupe combinée fourni par l'ANOVA.

L'analyse se poursuit par la partition de la variabilité estimée entre concentrations, de façon à obtenir des contrastes, ce qui permet d'établir les contrastes linéaires et quadratiques des réponses pour l'ensemble des niveaux de concentration. Lorsqu'il y a une interaction significative sexe x concentration, ce terme peut à son tour être partitionné en contrastes d'interaction linéaire x sexe et quadratique x sexe. Ces termes permettent de vérifier si les réponses aux concentrations sont parallèles pour les deux sexes ou si elles diffèrent selon le sexe.

L'estimation de la variabilité intra-groupe combinée peut servir à tester l'écart entre les moyennes en les comparant deux à deux. Ces comparaisons peuvent se faire entre les moyennes pour les deux sexes et entre les moyennes pour les différents niveaux de concentration (comparaisons avec les témoins négatifs, par exemple). En cas d'interaction significative, des comparaisons peuvent être faites entre les moyennes des différentes concentrations pour un même sexe, ou entre les moyennes des deux sexes à la même concentration.

---

<sup>1</sup> Les statisticiens qui suivent une démarche de modélisation telle que l'utilisation de modèles linéaires généralisés (MLG) peuvent conduire l'analyse d'une manière différente mais comparable ; toutefois, ils ne dériveront pas nécessairement le traditionnel tableau ANOVA, qui remonte à des conceptions algorithmiques du calcul statistique développées à une ère pré-informatique.

*Références*

De nombreux manuels de statistiques traitent de la théorie, de la conception, de la méthodologie, de l'analyse et de l'interprétation des plans factoriels, depuis les analyses les plus simples, à deux facteurs, jusqu'aux formes complexes utilisées dans la conception de l'expérimentation. La liste ci-dessous n'est pas exhaustive. Certains ouvrages comportent des exemples d'application de ce type de démarches, accompagnés parfois d'un code permettant l'exécution des analyses sous différents logiciels.

Box, G.E.P, Hunter, W.G. et Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.