

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

Essai de Mutation Létale Dominante chez le Rongeur

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 LD 478 initiale a été adoptée en 1984. La présente version modifiée de cette ligne directrice reflète plus de trente années d'expérience de cet essai et tient compte des possibilités de l'intégrer ou de le combiner à d'autres essais de toxicité, notamment pour le développement, la reproduction ou encore des essais de génotoxicité; cependant, étant donné les limitations de l'essai et le grand nombre d'animaux utilisés, cet essai n'a pas vocation à être utilisé en première intention, mais plutôt comme méthode d'essai supplémentaire quand il n'existe pas d'alternative pour satisfaire les exigences réglementaire. Combiner différents essais de toxicité permet potentiellement d'épargner un grand nombre d'animaux utilisés dans les tests. 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 de mutation létale dominante a pour but de détecter si certains produits chimiques engendrent des mutations résultant d'aberrations chromosomiques dans les cellules germinales. En outre, l'essai de mutation létale dominante se prête 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'apparition d'une mutation létale dominante à la suite d'une exposition à un produit chimique d'essai indique que cette substance a affecté le tissu germinale de l'animal étudié.

3. Les mutations létales dominantes provoquent la mort de l'embryon ou du fœtus. L'apparition d'une mutation létale dominante à la suite d'une exposition à un produit chimique indique que cette substance a affecté les cellules germinales de l'animal étudié.

4. Un essai de mutation létale dominante permet de confirmer les résultats positifs d'essais utilisant des indicateurs somatiques *in vivo*, et constitue un indicateur pertinent pour prédire le risque chez l'homme de pathologies génétiques transmises par le biais des cellules germinales. Cependant cet essai requiert l'utilisation d'un grand nombre d'animaux et mobilise beaucoup de temps de travail, le rendant onéreux et

fastidieux à mener. Étant donné la fréquence importante de mutations dominantes létales spontanées, la sensibilité de l'essai pour détecter de faibles augmentations dans la fréquence des mutations est généralement limitée.

5. Les définitions des termes clés figurent à l'annexe 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

6. La plupart du temps, l'essai est conduit sur des souris (2) (3) (4), mais d'autres espèces, telles que le rat (5) (6) (7) (8), peuvent être utilisées si cela est justifié sur le plan scientifique. Si, en général, les mutations létales dominantes résultent d'aberrations chromosomiques majeures (anomalies structurales et numériques) (9) (10) (11), l'éventualité de mutations génétiques ne peut être écartée. Une mutation létale dominante est une mutation qui se produit dans une cellule germinale, ou qui se fixe après la fécondation dans le jeune embryon, et qui n'entraîne pas de dysfonctionnement du gamète, mais qui est mortelle pour l'œuf fécondé ou pour l'embryon en cours de développement.

7. Des mâles identifiés sont accouplés successivement avec des femelles vierges, à des intervalles appropriés. Le nombre d'accouplements après le traitement dépend de l'objectif final de l'étude de mutation létale dominante (paragraphe 23) et doit garantir l'évaluation des mutations létales dominantes à toutes les phases de maturation des cellules germinales mâles (12).

8. Cet essai n'est pas pertinent s'il est prouvé que le produit chimique ou son/ses métabolite(s), n'atteindront pas le testicule.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

9. En général, des animaux mâles sont exposés à un produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine puis accouplés avec des femelles vierges non traitées. Différents types de cellules germinales peuvent être testées en utilisant différents intervalles d'accouplement. À la suite de l'accouplement, les femelles sont euthanasiées après une période de temps appropriée et leur utérus est examiné afin de déterminer le nombre d'embryons implantés, ainsi que celui des embryons vivants et morts. Pour déterminer la létalité dominante d'un produit chimique d'essai, le nombre d'embryons implantés vivants par femelle dans le groupe traité est comparé au nombre d'embryons implantés vivants par femelle dans le groupe témoin véhicule/solvant. L'augmentation du nombre d'embryons implantés morts par femelle dans le groupe traité par rapport au groupe témoin reflète la perte après implantation causée par le produit chimique testé. La perte après implantation est calculée en déterminant le rapport du nombre d'embryons implantés morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe traité et en le comparant au rapport du nombre d'embryons implantés morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe témoin. La perte avant implantation peut être évaluée en retranchant au nombre de corps jaunes le nombre total d'embryons implantés, soit le nombre total d'implants par femelle dans le groupe traité et dans le groupe témoin.

VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

10. La compétence à mener cet essai est établie sur la base d'informations démontrant l'aptitude à reproduire des fréquences de mutations létales dominantes à partir de données publiées (par exemple (13) (14) (15) (16) (17) (18)) avec les substances chimiques utilisées comme témoins positifs (réponses faibles comprises) telles que celles énumérées dans le tableau 1, et les témoins contenant le véhicule, et à obtenir des fréquences de témoin négatif cohérentes avec la plage de données acceptable relatives aux témoins

(voir références ci-dessus) ou avec la distribution des données des témoins historiques du laboratoire, le cas échéant.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Préparations

Choix des espèces animales

11. Il convient d'employer des animaux sains et sexuellement matures issus de souches de laboratoire courantes. Les souris sont habituellement utilisées, mais les rats 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

12. 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. On dispense un éclairage artificiel faisant alterner des séquences de 12 heures de lumière et de 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. Avant le traitement ou l'accouplement, les rongeurs doivent être mis en cage par petits groupes (de cinq maximum) du même sexe si aucun comportement agressif n'est à craindre ou n'est observé, de préférence dans des cages solides dotées d'un enrichissement environnemental approprié. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié sur le plan scientifique.

Préparation des animaux

13. Des animaux adultes mâles et femelles, sains et sexuellement matures, sont répartis au hasard entre le groupe témoin et les groupes traités. 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 $\pm 20\%$ du poids moyen de chaque sexe.

Préparation des doses

14. 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.

*Conditions de l'essai**Solvant/véhicule*

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

Témoins positifs

16. Des animaux témoins positifs sont toujours inclus simultanément dans l'essai, à moins que le laboratoire n'ait déjà démontré ses compétences dans la conduite de l'essai et n'ait mené le test en routine récemment (par exemple dans les cinq dernières années). Toutefois, il n'est pas nécessaire de leur administrer le produit témoin positif par la même voie que celle du produit chimique testé, ni de réaliser des prélèvements à chaque intervalle d'accouplement. Les substances utilisées comme témoins positifs doivent induire des mutations létales dominantes de façon fiable et dans les mêmes conditions que l'essai. À l'exception du traitement administré, les animaux des groupes témoins sont traités de la même manière que ceux des groupes de traitement.

17. Les doses des substances chimiques utilisées comme témoins positifs sont sélectionnées de manière à produire des effets faibles ou modérés qui permettent d'évaluer de manière critique les performances et la sensibilité de l'essai, mais qui induisent systématiquement des effets létaux dominants. Des exemples de substances chimiques utilisés comme témoins positifs, et des doses idoines, figurent au tableau 1 ci-dessous.

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

Substance chimique [n° CAS] (référence)	Plage de dose effective (mg/kg) (rongeurs)	Période d'administration (en nombre de jours)
Triéthylènemélatamine [n° CAS 51-18-3] (15)	0.25 (souris)	1
Cyclophosphamide [n° CAS 50-18-0] (19)	50-150 (souris)	5
Cyclophosphamide [n° CAS 50-18-0] (5)	25-100 (rats)	1
Méthanesulfonate d'éthyle [n° CAS 62-50-0] (13)	100-300 (souris)	5
Acrylamide monomère [n° CAS 79- 06-1] (17)	50 (souris)	5
Chlorambucil [305-03-3] (14)	25 (souris)	1

Témoins négatifs

18. Les animaux témoins négatifs, traités seulement avec le solvant ou avec le véhicule, et traités par ailleurs de manière identique aux groupes témoins, sont inclus à chaque moment de prélèvement (20). En l'absence de données significatives observées ou publiées montrant que le solvant/véhicule choisi n'induit pas de mutation létale dominante ou d'autres effets délétères, des animaux témoins non traités sont également inclus à chaque moment de prélèvement afin d'établir l'acceptabilité du témoin contenant le véhicule.

MODE OPERATOIRE*Nombre d'animaux*

19. Des mâles identifiés sont accouplés successivement à des intervalles appropriés prédéterminés (par exemple une fois par semaine, paragraphes 21 et 23) de préférence à une femelle vierge. Un nombre suffisamment important de mâles est prévu (et un nombre correspondant de femelles accouplées à chaque intervalle d'accouplement) afin d'obtenir l'efficacité statistique nécessaire pour détecter une fréquence de mutation létale dominante au moins multipliée par deux (paragraphe 44).

20. Le nombre de femelles par intervalle d'accouplement doit également être défini à l'avance par calculs statistiques, afin de pouvoir détecter au minimum un doublement de la fréquence de mutation létale dominante (c'est-à-dire suffisamment de femelles gravides pour obtenir au moins 400 embryons implantés au total) (20) (21) (22) (23) et escompter au moins un embryon implanté mort par unité d'analyse (soit par groupe d'accouplement et par dose) (24).

Période d'administration et intervalles d'accouplement

21. Le nombre d'accouplements faisant suite au traitement est régi par le déroulement du traitement et doit assurer l'évaluation d'inductions de mutations létales dominantes à toutes les phases de maturation des cellules germinales mâles (12) (25). Pour un traitement unique impliquant jusqu'à cinq doses administrées quotidiennement, il faut compter 8 (pour les souris) ou 10 (pour les rats) accouplements à une semaine d'intervalle après le dernier traitement. En cas d'administrations multiples, le nombre d'accouplements peut être réduit proportionnellement à l'allongement de la période d'administration, tout en conservant pour objectif d'évaluer toutes les phases de la spermatogenèse (par exemple, après une exposition de 28 jours, seuls 4 accouplements par semaine suffisent à évaluer toutes les phases de la spermatogenèse chez la souris). Tous les calendriers de traitement et d'accouplement doivent être scientifiquement justifiés.

22. Les femelles doivent être laissées avec les mâles au moins pendant la durée d'un cycle œstral (par exemple, une semaine couvre un cycle œstral chez la souris et le rat). Les femelles qui ne se sont pas accouplées au cours d'une semaine donnée peuvent être utilisées pour un autre intervalle d'accouplement, ou jusqu'à ce que l'accouplement ait eu lieu, ce qu'indique la présence de sperme dans le vagin ou d'un bouchon vaginal.

23. Le régime d'exposition et d'accouplement retenu dépend de l'objectif final de l'étude de mutation létale dominante. Si elle a pour but de déterminer si un produit chimique donné induit des mutations létales dominantes *per se*, la méthode retenue consistera alors en l'exposition d'un cycle entier de spermatogenèse (soit 7 semaines chez la souris, à raison de 5 à 7 traitements par semaine) et en un accouplement à la fin du cycle. Cependant, si l'objectif est de recenser le type de cellule germinale sensible à une induction de mutation létale dominante, on préférera une exposition unique ou de 5 jours, suivie d'un accouplement hebdomadaire.

Niveaux de dose

24. 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 (26). 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, comportement ou réactions anormaux, baisse mineure du poids corporel ou cytotoxicité du système hématopoïétique), mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant d'euthanasier les animaux (27).

25. En outre, la DMT ne doit pas affecter l'accouplement (21).

26. Les produits chimiques d'essai ayant une activité biologique spécifique à des niveaux de doses faibles et non toxiques (telles que les hormones et les mitogènes) et ceux dont les propriétés toxicocinétiques sont saturées peuvent être considérés comme des exceptions aux critères de détermination des doses et sont évalués au cas par cas.

27. 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. Pour les substances non toxiques, la dose limite pour une période d'administration de 14 jours ou plus est de 1 000 mg/kg de poids corporel, et pour des périodes d'administration de moins de 14 jours, la dose limite est de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour.

Administration des doses

28. 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, ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse, orale (par gavage) ou l'implantation sont autant de choix qui peuvent être considérés comme 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 l'accouplement est suffisant pour permettre une détection des effets (paragraphe 31). 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 (si la législation relative au bien-être animal le permet) doit être justifiée. Il convient de minimiser la variabilité du volume testé en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant par rapport au poids corporel à tous les niveaux de doses.

Observations

29. 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. Chaque animal doit être pesé au début de l'étude et au moins une fois par semaine pendant les études à doses répétées, ainsi qu'au moment de l'euthanasie. La consommation alimentaire est 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 (27).

Collecte et traitement des tissus

30. Les femelles sont euthanasiées au cours de la seconde moitié de la gestation, au 13^e jour de gestation pour les souris et au 14-15^e jour de gestation pour les rats. Le contenu de l'utérus est examiné afin de déterminer les effets létaux dominants et de recenser le nombre d'embryons implantés, le nombre d'embryons vivants et morts ainsi que le nombre de corps jaunes.

31. Les cornes utérines et les ovaires sont exposés pour permettre de compter le nombre de corps jaunes, et les fœtus sont ôtés, comptés et pesés. Il convient d'examiner soigneusement l'utérus en vue de déceler et de comptabiliser toutes les résorptions, y compris celles dissimulées par les fœtus vivants. La mortalité fœtale est consignée. Le nombre de femelles fécondées ainsi que le nombre total d'embryons implantés, de pertes avant implantation et de mortalité après implantation (y compris les résorptions précoces et tardives) sont également consignés. De plus, les fœtus visibles peuvent être conservés dans une

solution de Bouin pendant au moins 2 semaines, pour un examen ultérieur des principales malformations externes (28) permettant de fournir des informations supplémentaires sur les effets du produit testé sur la reproduction et le développement.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

32. Les résultats doivent être présentés sous forme d'un tableau qui indique le nombre de mâles accouplés, le nombre de femelles gravides et le nombre de femelles non gravides. Les résultats de chaque accouplement, comprenant l'identité de chaque mâle et de chaque femelle, doivent être mentionnés individuellement. Pour chaque femelle, il convient d'indiquer l'intervalle d'accouplement, le niveau de la dose reçue par les mâles traités et le nombre d'embryons implantés vivants et morts.

33. La perte après implantation est calculée en déterminant le rapport du nombre d'embryons implantés morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe traité et en le comparant au rapport du nombre d'embryons implantés morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe témoin traité avec le véhicule/solvant.

34. La perte avant implantation est calculée comme étant la différence entre le nombre de corps jaunes et le nombre d'embryons implantés ou la réduction du nombre moyen d'embryons implantés par femelle par comparaison avec les accouplements témoins. Quand la perte avant implantation a été évaluée, elle doit être mentionnée.

35. Le facteur létal dominant est estimé comme suit : (embryons morts avant implantation/total des embryons implantés par femelle) x 100.

36. Les données de toxicité et les signes cliniques tels que décrits dans le paragraphe 29 sont consignés dans le rapport.

Critères d'acceptabilité

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

- a. le témoin négatif utilisé simultanément est cohérent avec les normes publiées pour les données relatives aux témoins négatifs historiques ainsi qu'avec les données des témoins historiques du laboratoire, le cas échéant (paragraphe 10 et 18) ;
- b. les témoins positifs utilisés simultanément induisent des réponses cohérentes avec les normes publiées pour les données relatives aux témoins positifs historiques ou avec la base de données des témoins positifs historiques du laboratoire, le cas échéant, et produisent une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (voir paragraphes 17 et 18) ;
- c. le nombre idoine d'embryons implantés et de doses est analysé (paragraphe 20) ;
- d. les critères de sélection de la dose maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 24 et 27.

Évaluation et interprétation des résultats

38. Au moins trois groupes de traitement sont analysés pour obtenir des données suffisantes pour l'analyse de la relation dose-réponse.

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

- a) au moins une des doses d'essai présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant ;
- b) un test approprié montre que l'augmentation est liée à la dose dans au moins une condition expérimentale (par exemple un intervalle d'accouplement d'une semaine) ; et
- c) des résultats se situent à l'extérieur de la plage acceptable relative aux témoins négatifs, ou des données relatives aux témoins négatifs historiques du laboratoire (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson), le cas échéant.

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des mutations létales dominantes dans les cellules germinales des animaux testés. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées figurent au paragraphe 44 ; d'autres approches statistiques recommandées sont également disponibles dans la littérature (20) (21) (24) (29). Les méthodes statistiques employées considèrent l'animal comme unité expérimentale.

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

- a. aucune dose d'essai ne présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant ;
- b. aucune condition expérimentale n'a révélé une augmentation liée à la dose ; et
- c. l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la plage acceptable des données relatives aux témoins négatifs, ou des données relatives aux témoins négatifs historiques du laboratoire (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson), le cas échéant.

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme capable d'induire des mutations létales dominantes dans les cellules germinales des animaux testés.

41. Il n'est pas nécessaire de vérifier une réponse clairement positive ou clairement négative.

42. Si 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 faire l'objet de recherches supplémentaires à l'aide des données expérimentales existantes, notamment les éléments indiquant si le résultat positif se trouve à l'extérieur de la plage acceptable concernant les témoins négatifs¹, ou de la distribution des données du laboratoire concernant les témoins négatifs historiques (30).

43. Dans de rares cas, même après de nouvelles investigations, l'ensemble de données ne permettra pas de conclure que les résultats sont positifs ou négatifs ; les résultats seront alors déclarés équivoques.

44. Les méthodes statistiques employées considèrent l'animal mâle comme unité expérimentale. S'il est possible que le décompte (par exemple le nombre d'embryons implantés par femelle) suive la loi de Poisson et/ou que certaines proportions (par exemple une proportion d'embryons implantés morts) présentent une distribution binomiale, on observe souvent une surdispersion de ces données (31). Par conséquent, les analyses statistiques doivent d'abord recourir à un test de surdispersion ou de sousdispersion basé sur des tests de la variance tels que le test de variance binomiale de Cochran (32) ou le test de la $C(\alpha)$ de Tarone pour la surdispersion binomiale (31) (33). Si aucun écart par rapport à la dispersion binomiale n'est observé, un test de tendance de Cochran-Armitage peut être effectué pour les tendances de proportions dans les différents niveaux de doses (34) et des comparaisons par paires avec le groupe témoin peuvent être faites à l'aide d'un test exact de Fisher (35). De même, si aucun écart par rapport à la dispersion de Poisson n'est détecté, les tendances des décomptes peuvent être testées à l'aide de la régression de Poisson (36) et des comparaisons par paires avec le groupe témoin peuvent être réalisées dans le contexte du modèle de Poisson, à l'aide de contrastes par paires (36). Si une surdispersion ou une sousdispersion significative est détectée, il est recommandé de recourir à des méthodes non paramétriques (23, 31), notamment les tests par les rangs tels que le test de tendance de Jonckheere-Terpstra (37) et les tests de Mann-Whitney (38) pour les comparaisons par paires avec le groupe témoin traité avec le véhicule/solvant, mais aussi les tests de permutation, de rééchantillonnage ou de bootstrap pour les comparaisons de tendances et les comparaisons par paires avec le groupe témoin (31) (39).

45. Un essai positif de mutation létale dominante met en lumière la génotoxicité du produit chimique d'essai sur les cellules germinales du mâle traité de l'espèce testée.

46. Le fait d'examiner si les valeurs observées se situent à l'intérieur de la plage des témoins historiques peut fournir des indications au moment de l'évaluation de la signification biologique de la réponse (40).

Rapport d'essai

47. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

Résumé.

Produit chimique d'essai :

- source, numéro de lot, date limite d'utilisation si disponibles ;
- stabilité du produit chimique d'essai, si elle est connue ;
- solubilité et stabilité du produit chimique d'essai dans le solvant, si elles sont connues ;
- mesure du pH, de l'osmolalité et de la précipitation dans le milieu de culture auquel le produit chimique d'essai a été ajouté, le cas échéant.

Substance mono-constituant :

- apparence physique, hydrosolubilité, 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 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 du choix ;
- 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 corporel de chaque mâle 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 de l'essai :

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule) ;
- données de l'étude préliminaire de détermination des concentrations ;
- justification du choix des doses ;
- détails sur la préparation du produit chimique d'essai ;
- détails sur l'administration du produit chimique d'essai ;
- justification du choix de la voie d'administration ;
- méthodes de mesure de la toxicité animale, y compris, si elles existent, analyses histopathologiques ou hématologiques et fréquence des observations animales et des mesures du poids corporel ;
- méthodes permettant de vérifier que le produit chimique testé a atteint le tissu cible ou la circulation sanguine en cas de résultats négatifs ;
- 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 ;
- détails de l'enrichissement environnemental des cages ;
- description détaillée des programmes de traitement et d'échantillonnage, et justification des choix ;
- méthode d'analgésie ;
- méthode d'euthanasie ;
- procédures d'isolement et de conservation des tissus ;
- source et numéros de lot de l'ensemble du matériel et de tous les réactifs (s'il y a lieu) ;
- méthodes d'énumération des mutations létales dominantes ;
- programme d'accouplement ;
- méthodes utilisées pour déterminer si l'accouplement a eu lieu ;
- moment de l'euthanasie ;
- critères permettant d'examiner les effets létaux dominants, y compris les corps jaunes, les embryons implantés, les résorptions et les pertes avant implantation, les embryons implantés vivants, les embryons implantés morts.

Résultats :

- état de santé des animaux avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité ;
- poids corporel des mâles pendant le traitement et les périodes d'accouplement ;
- nombre de femelles accouplées ;
- relation dose-réponse, si possible ;
- données relatives aux animaux témoins négatifs concomitants et données des témoins négatifs historiques avec plages, moyennes et écarts-types ;
- données des témoins positifs concomitants ;
- tableau de données pour chaque femelle gravide comprenant : le nombre de corps jaune ; le nombre d'embryons implantés ; le nombre de résorptions et de pertes avant implantation ; le nombre d'embryons implantés vivants ; le nombre d'embryons implantés morts ; le poids des fœtus ;
- résumé des données ci-dessus pour chaque période d'accouplement et pour chaque dose, avec la fréquence des effets létaux dominants ;
- analyse de terminations, si disponible ;
- analyses et méthodes statistiques employées.

Discussion des résultats.

Conclusion.

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) Bateman, A.J. (1977). The dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Kilbey B.J. *et al.* (Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam.
- (3) Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Froberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Peh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., et Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Élaboré par le Groupe de Travail « Dominant Lethal Mutations of the AD Hoc Committee Chemogenetics », *Arch. Toxicol.* 39, 173-185.
- (4) Shelby, M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. *Mutation Res.*, 352 :159-167
- (5) Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. et Poulsen, E. (1977). A Proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. *Mutation Res.*, 48 :267-270.
- (6) Anderson, D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. et Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. *Mutation. Res.*, 397 :77-74.
- (7) Shively, C.A., White, D.M., Blauch, J.L. et Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol. Lett.* 20 :325-329.
- (8) Rao, K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. et Miller, R.R. (1983) Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and Dominant Lethal Studies in Rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* 3 :80-85 (1983).
- (9) Brewen, J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., et Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, *Mutation Res.*, 33, 239-249.
- (10) Marchetti, F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. et Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. *Biol. Reprod.* 70 :616-624
- (11) Marchetti F. et Wyrobek A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. *Birth Defects Res.*, C 75 :112-129.
- (12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. *Mutation Res.*, 352 :169-172.
- (13) Favor J., et Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, *Mutation Res.*, 53 : 21-27.
- (14) Generoso, W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. et Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. *Mutation Res.*, 345 :167-180.

- (15) Hastings SE, Huffman KW et Gallo MA. (1976). The Dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, *Mutation Res.*, 40 :371-378.
- (16) James, D.A. et Smith, D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, *Mutation Res.*, 99 :303-314
- (17) Shelby, M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. et Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. *Mutation Res.*, 173 :35-40.
- (18) Sudman, P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. et Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, *Mutation Res.*, 296 : 143-156.
- (19) Holstrom L.M. et Palmer A.K. (1993). Favor, J. The Rodent Dominant Lethal Assay. In *Supplementary Mutagenicity Tests*. (eds) D.J. Kirkland et M. Fox, Cambridge University Press, pp. 129-156.
- (20) Adler, I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. et Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, *Mutation Res.*, 417 :19-30.
- (21) Adler, I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. et Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Rapport de synthèse du groupe de travail « Working Group on Mammalian Germ Cell Tests ». *Mutation Res.*, 312 :313-318.
- (22) Generoso, W.M. et Piegorsch, W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. *Methods Toxicol.* 3A:124-141.
- (23) Haseman, J.K. et Soares, E.R. (1976). The distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. *Mutation Res.*, 41 : 277-288.
- (24) Whorton, E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 1 :353-360.
- (25) Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., et Purchase, I.F.H.(1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. *Mutation Res.*, 85 :417-429.
- (26) 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. et Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagen.* 7 :313-319.
- (27) OCDE. (2000). « Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation », Publications d'Environnement, Santé et Sécurité, Série de l'OCDE sur les Essais et Evaluations, (No. 19.), Organisation de Coopération et de Développement Economique, Paris..
- (28) Barrow, M.V. et Taylor, W.J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses. *J. Morphol.* 127, 291-306.

- (29) Kirkland, D.J., (Ed.). (1989). *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. Cambridge University Press,
- (30) Hayashi, M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. et Thybaud V.. (2011). "Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", *Mutation. Res.*, 723 :87-90.
- (31) Lockhart, A.C. Piegorsch, W.W. et Bishop J.B. (1992). Assessing Overdispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. *Mutation Res.*, 272 :35-58.
- (32) Cochran, W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common χ^2 Tests. *Biometrics* 10 : 417-451.
- (33) Tarone, R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika* 66 : 585-590.
- (34) Margolin, B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of Statistical Sciences*, Volume 9, S. Kotz et N. L. Johnson (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York
- (35) Cox, D.R., *Analysis of Binary Data*. Chapman and Hall, London. (1970).
- (36) Neter, J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. et Wasserman, W. (1996). *Applied Linear Statistical Models*, Quatrième Edition, Chapitres 14 et 17. McGraw-Hill, Boston.
- (37) Jonckheere, R.. (1954). A distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika* 41 :133-145.
- (38) Conover W.J. (1971). *Practical Nonparametric Statistics*. John Wiley and Sons, New York
- (39) Efron, B. (1982). *The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans*. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphie, PA.
- (40) Fleiss J. (1973). *Statistical Methods for Rates and Proportions*. John Wiley and Sons, New York.

ANNEXE 1

DÉFINITIONS

Corps jaune : formation à l'intérieur de l'ovaire qui résulte de la transformation d'un follicule ayant expulsé l'ovocyte et qui a un rôle hormonal. Le nombre de corps jaunes dans les ovaires correspond au nombre d'ovocytes produits.

Intervalle d'accouplement : laps de temps entre la fin de l'exposition et l'accouplement des mâles traités. Le contrôle de cet intervalle permet d'évaluer les effets des produits chimiques sur différents types de cellules germinales. L'accouplement des souris au cours des semaines 1, 2, 3, 4, 5, 6, et 7 qui suivent la fin de l'exposition mesure les effets sur le sperme testiculaire, les spermatides condensées, les spermatides rondes, les spermatocytes au stade pachytène, les spermatocytes précoces, les spermatogonies différenciées, les spermatogonies en cours de différenciation et les spermatogonies des cellules souches.

Mutation létale dominante : mutation qui se produit dans une cellule germinale ou qui se fixe après la fécondation, et qui est mortelle pour l'embryon ou le fœtus.

Pertes après implantation : rapport du nombre d'embryons morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe traité comparé au rapport du nombre d'embryons morts au nombre total d'embryons implantés dans le groupe témoin.

Pertes avant implantation : différence entre le nombre d'embryons implantés et le nombre de corps jaunes. Elles peuvent aussi être estimées en comparant le nombre total d'embryons implantés par femelle dans les groupes traités et dans les groupes témoins.

Taux de fertilité : nombre de femelles gravides divisé par le nombre total de femelles accouplées.

ANNEXE 2

CYCLE DE LA SPERMATOGENÈSE CHEZ LES MAMMIFÈRES

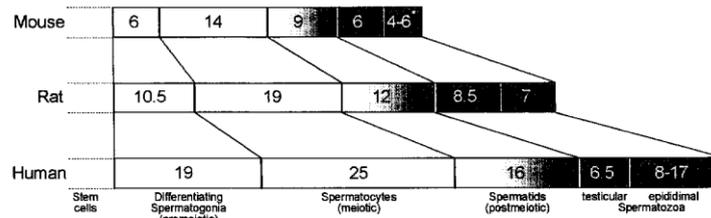


Fig. 1. Comparison of the duration (days) of male germ cell development in mice, rats and humans. DNA repair does not occur during the periods indicated by shading.

Légende

Souris / Rat / Homme

Cellules souches / Spermatogonies différenciées (avant méiose) / Spermatocytes (méiose) / Spermatides (après méiose) / Spermatozoïdes testiculaires / Spermatozoïdes épидидymaires

Graphique 1. Comparaison de la durée (en jours) du développement des cellules germinales mâles chez la souris, le rat et l’homme. La réparation de l’ADN ne se produit pas pendant les périodes indiquées en grisé.

Cycle de la spermatogenèse chez la souris, le rat et l’homme (Adler, 1996). Les spermatogonies indifférenciées incluent les spermatogonies A-single, A-paired, et A-aligned (Hess et de Franca, 2008). Les A-single sont considérées comme les véritables cellules souches. C’est pourquoi, pour évaluer les effets sur les cellules souches, au moins 49 jours (chez la souris) doivent s’écouler entre la dernière injection du produit chimique testée et l’accouplement.

RÉFÉRENCES

Adler, ID (1996) Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. *Mutat Res*, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008) Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In : *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences et Springer Science+Business Media, pp. 1-15.