

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

### **Essai d'Aberration Chromosomique sur Spermatogonies 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 483 originale a été adoptée en 1997. La présente version modifiée de la ligne directrice reflète les connaissances scientifiques acquises après de nombreuses années d'expérience de cet essai et tient compte des possibilités de l'intégrer ou de le combiner à d'autres études de toxicité ou de génotoxicité. Combiner différentes études de toxicité permet potentiellement de réduire le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ces essais. La présente ligne directrice 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 pratiqué *in vivo* sur des spermatogonies de mammifères est destiné à détecter les produits chimiques qui causent des aberrations chromosomiques structurales dans les cellules de spermatogonies de mammifère (2) (3) (4). Par ailleurs, cet essai 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. Ce test n'est pas conçu pour mesurer les aberrations numériques, et n'est pas utilisé de façon régulière dans ce but.

3. Cet essai mesure les aberrations chromosomiques structurales (de type chromosomique et chromatidique) qui surviennent dans les spermatogonies et devrait par conséquent permettre de prévoir l'induction de mutations héritées dans les cellules germinales.

4. Les définitions des termes clés figurent en annexe.

#### **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. Les préparations cytogénétiques standard des essais réalisés sur rongeurs permettent l'obtention de métaphases mitotiques (spermatogonies) et méiotiques (spermatocytes). Ces métaphases sont identifiées en fonction de la morphologie des chromosomes (4). Cet essai cytogénétique *in vivo* détecte les aberrations chromosomiques structurales dans les mitoses des spermatogonies. Les autres cellules cibles ne sont pas concernées par la présente ligne directrice.

## 483 OECD/OCDE

6. Afin de détecter les aberrations chromatidiques dans les cellules de spermatogonies, il faut examiner la première division cellulaire mitotique après le traitement, avant que ces aberrations n'évoluent en aberrations chromosomiques dans les divisions cellulaires ultérieures. Des informations complémentaires peuvent être obtenues après traitement des spermatocytes, à partir de l'analyse des chromosomes méiotiques mettant en évidence les aberrations chromosomiques structurales aux stades de la diacinèse et des métaphases I et II.

7. Les testicules contiennent plusieurs générations de spermatogonies (5). Ces différentes cellules germinales peuvent présenter des sensibilités diverses au traitement chimique. De ce fait, les aberrations détectées sont une réponse globale des populations de cellules de spermatogonies traitées. La majorité des cellules mitotiques présentes dans les préparations de testicules sont des spermatogonies de type B, dont le cycle cellulaire dure environ 26 heures (3).

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

### PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

9. En règle générale, les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine et sont euthanasiés à des délais appropriés 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 effectuées à partir des cellules germinales sont colorées et les cellules en métaphase sont analysées pour mettre en évidence les aberrations chromosomiques.

### VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE

10. La compétence à mener cet essai est établie sur la base d'informations démontrant l'aptitude à reproduire les résultats escomptés concernant la fréquence des aberrations chromosomiques structurales dans les spermatogonies avec des substances chimiques utilisées comme témoins positifs (réponses faibles comprises) telles que celles énumérées dans le tableau 1 et à obtenir une fréquence avec témoins négatifs qui soit cohérente avec la plage acceptable des données publiées dans la littérature (par exemple (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)) 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 de jeunes animaux adultes sains issus de souches courantes de laboratoire. On utilise communément des souris mâles, mais des mâles d'autres espèces de mammifères appropriées peuvent cependant être employés si cela est justifié sur le plan scientifique, et si cela permet de combiner cette étude à une autre ligne directrice sur les essais. L'utilisation d'une espèce autre que les rongeurs doit être scientifiquement justifiée 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. 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 (cinq au maximum par cage), 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*

13. De jeunes adultes mâles en bonne santé (âgés de 8-12 semaines au début du traitement) sont normalement utilisés et sont répartis au hasard dans 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 entre chaque animal doit être minimale et ne pas dépasser  $\pm 20\%$ .

#### *Préparation des doses*

14. Les produits chimiques solides sont dissouts, mis en suspension dans des solvants ou véhicules appropriés ou incorporés dans les aliments ou dans 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 expérimentales - Solvant/véhicule*

15. Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées, ni pouvoir réagir avec les substances 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 observées ou publiées montrant que le véhicule/solvant inhabituel sélectionné n'induit aucune aberration chromosomique structurale ou effet délétère, une étude initiale devra être réalisée afin d'établir l'acceptabilité du témoin de solvant/véhicule.

#### *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). Quand un témoin positif n'est pas testé en parallèle, des témoins d'analyse (lames fixées non colorées) doivent être compris dans chaque expérience. Ceux-ci peuvent être obtenus en incluant dans chaque étude des échantillons de référence en provenance de témoins positifs d'autres études conduites de façon périodique (par exemple tous les 6-18 mois) dans le

## 483 OECD/OCDE

laboratoire où le test est effectué, par exemple lors d'épreuves de compétence, et de façon plus régulière par la suite.

17. 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. 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.

Substance chimique et n° CAS (référence n°)
Cyclophosphamide [n° CAS 50-18-0] cyclophosphamide monohydratée [n° CAS 6055-19-2] (9)
Cyclohexylamine [n° CAS 108-91-8] (7)
Mitomycine C [n° CAS 50-07-7] (6)
Acrylamide monomère [n° CAS 79-06-1] (10)
Triéthylènemélamine [n° CAS 51-18-3] (8)

### *Témoins négatifs*

18. Les animaux servant de témoins négatifs, traités seulement avec le solvant ou avec le véhicule, et traités par ailleurs de manière identique aux groupes de traitement, sont inclus à chaque moment de prélèvement. En l'absence de données observées ou publiées montrant que le solvant/véhicule choisi n'induit pas d'aberrations chromosomiques 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.

## PROCÉDURE

### *Nombre d'animaux*

19. La taille des groupes au début de l'étude doit permettre de disposer d'au moins cinq animaux mâles dans chaque groupe. Ce nombre d'animaux par groupe est considéré comme suffisant pour fournir une efficacité statistique idoine (c'est-à-dire généralement capable de détecter au moins un doublement de la fréquence des aberrations chromosomiques lorsque le niveau du témoin négatif est de 1.0 % ou plus assorti d'une probabilité de 80 % à un niveau de signification de 0.05) (3) (11). À titre d'information, concernant les exigences relatives au nombre maximum d'animaux généralement utilisés, une étude comptant deux moments de prélèvement et impliquant trois groupes de traitement, un groupe de témoins négatifs concomitants et un groupe de témoins positifs (chaque groupe étant composé de cinq animaux) nécessitera 45 animaux.

### *Déroulement du traitement*

20. Les produits chimiques d'essai sont habituellement administrés une seule fois (c'est-à-dire en un seul traitement). D'autres régimes de dosage sont acceptables pour autant qu'ils soient scientifiquement justifiés.

21. Dans le groupe qui reçoit la dose la plus forte, les prélèvements sont effectués à deux intervalles après le traitement. Étant donné que le temps requis par l'absorption et la métabolisation de la (des) substance(s) d'essai, ainsi que son (leur) effet sur la cinétique du cycle cellulaire peuvent influencer sur le moment optimal pour la détection des aberrations chromosomiques, deux prélèvements sont donc effectués, le premier, précoce aux environs de 24 heures et le deuxième, tardif, autour de 48 heures après le traitement. S'agissant des niveaux de dose inférieurs à la dose la plus élevée, il convient de choisir un intervalle de prélèvement précoce de 24 heures (soit une durée inférieure ou égale à la durée du cycle cellulaire d'une spermatogonie B, ce qui optimise ainsi la probabilité de pouvoir analyser les premières métaphases post-traitement), à moins que l'on sache qu'il existe un autre délai de prélèvement justifié et plus propice à la détection des effets.

22. D'autres moments de prélèvement peuvent être retenus. Par exemple, dans le cas des produits chimiques susceptibles de provoquer des effets indépendants de la phase S, il peut être judicieux d'effectuer des prélèvements plus précoces (soit à un intervalle de moins de 24 heures).

23. Un régime de traitement à doses répétées peut être employé notamment dans les cas où cet essai est associé à un test sur un autre effet mesuré dont la période d'administration est de 28 jours (par exemple, la LD 488 de l'OCDE). Le cas échéant, cependant, des groupes d'animaux supplémentaires seront requis afin de tenir compte des différents délais de prélèvement. Par conséquent, le caractère approprié d'un tel programme doit être justifié sur le plan scientifique au cas par cas.

24. Avant l'euthanasie, les animaux reçoivent une dose appropriée d'un inhibiteur du fuseau (par exemple le Colcemid® ou la colchicine) par injection intrapéritonéale. Les échantillons sont prélevés après des délais appropriés. Pour les souris et les rats, ce délai est compris approximativement entre 3 et 5 heures.

### *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, conformément aux recommandations relatives aux études de détermination des doses (12). L'étude devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose entraînant de légers effets toxiques dans le cadre de la durée de l'étude (par exemple, en induisant un comportement ou des réactions anormales, une baisse mineure 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 une euthanasie de l'animal (13).

26. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans les cellules de spermatogonies (par exemple une diminution du rapport entre le nombre de mitoses des spermatogonies et le nombre des métaphases I et II de la méiose. Cette diminution ne doit cependant pas dépasser 50 %).

## 483 OECD/OCDE

27. Les produits chimiques testés ayant une activité biologique spécifique à des niveaux de doses faibles et non toxiques (telles que les hormones et les mitogènes) et les substances qui présentent une saturation des propriétés toxicocinétiques peuvent être considérés comme des exceptions aux critères de détermination des doses et sont évalués 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 (paragraphe 18) 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 (testicule) 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 substances testées (par exemple les produits pharmaceutiques à usage humain) faisant l'objet d'exigences spécifiques. Si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, il conviendra de choisir la dose limite ainsi que deux niveaux de doses inférieurs à cette dernière (tel que décrit ci-dessus). Pour une période d'administration égale ou supérieure à 14 jours, la dose limite est de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour, 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*

29. 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 et orale (par gavage) sont autant de choix qui peuvent être considérés comme justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du tissu cible. L'injection intrapéritonéale n'est normalement pas recommandée sauf si elle est scientifiquement justifiée car la cavité péritonéale n'est généralement pas une voie d'exposition humaine physiologiquement pertinente. 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 paragraphe 33). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Le volume ne doit normalement pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où un maximum de 2 ml/100 g est acceptable. L'administration 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*

30. 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, 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 (13).

### *Préparation des chromosomes*

31. Des cellules germinales en suspension obtenues à partir de l'une ou des deux testicules immédiatement après l'euthanasie sont exposées à une solution hypotonique et fixées selon les protocoles établis (2) (14) (15) par exemple). Les cellules sont alors étalées sur des lames et colorées (16) (17). Toutes les lames doivent être codées afin que leur identité ne soit pas révélée à l'examineur.

### *Analyse*

32. Il y a lieu d'examiner au moins 200 cellules en métaphase bien étalées pour chaque animal (3) (11). Si la fréquence des témoins négatifs historiques est  $<1\%$ , il convient alors d'examiner plus de 200 cellules/animal afin d'augmenter l'efficacité statistique (3). Le recours à des méthodes de coloration permettant l'identification du centromère est conseillé.

33. Il convient de consigner séparément les aberrations chromatidiques et chromosomiques et de les classer par sous-catégories (cassures, échanges). Les lacunes sont enregistrées mais non prises en compte pour déterminer si une substance induit une hausse notable de l'incidence des cellules porteuses d'aberrations chromosomiques. Les procédures en cours dans le laboratoire doivent assurer que l'analyse des aberrations chromosomiques est réalisée par des examinateurs qualifiés. 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.

34. Bien que l'essai soit destiné à détecter les aberrations chromosomiques structurales, il est important de rapporter la fréquence des cellules polyploïdes et de celles présentant des chromosomes endoredupliqués le cas échéant (voir paragraphe 44).

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### *Traitement des résultats*

35. Les résultats individuels pour chaque animal sont présentés sous forme de tableaux. Le nombre de cellules présentant une (des) aberration(s) chromosomique(s) structurale(s) et le nombre d'aberrations chromosomique(s) par cellule doivent être évalués pour chaque animal. Les aberrations chromatidiques et chromosomiques classées par sous-catégorie (cassure, échange) doivent être consignées séparément, avec leur nombre et leur fréquence pour les groupes traités et les groupes témoins. Les lacunes sont enregistrées séparément. La fréquence des lacunes est rapportée mais n'est généralement pas incluse dans l'analyse de la fréquence totale des aberrations chromosomiques structurales. Le pourcentage de cellules polyploïdes et de cellules présentant des chromosomes endoredupliqués est rapporté le cas échéant.

36. Les données de toxicité et les signes cliniques tels que décrits dans le paragraphe 30 sont consignés dans le rapport.

### *Critères d'acceptabilité*

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

## 483 OECD/OCDE

- a) Les témoins négatifs utilisés simultanément induisent des réponses cohérentes avec les normes publiées pour les données relatives aux témoins négatifs historiques, qui se situent généralement entre  $> 0\%$  et  $\leq 1.5\%$  cellules comportant des aberrations chromosomiques, ainsi qu'avec les données des témoins historiques du laboratoire, le cas échéant (voir paragraphes 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, 18).
- c) Le nombre idoine de cellules et de doses est analysé (voir paragraphes 28 et 32).
- d) Les critères de sélection de la dose maximale sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 25 et 26.

38. Lorsqu'on observe des mitoses ainsi que des méioses, il faut déterminer le rapport entre le nombre de mitoses des spermatogonies et le nombre de premières et secondes métaphases méiotiques pour tous les animaux traités et témoins négatifs, dans un échantillon total de 100 cellules en division par animal. Dans le cas où il s'agit uniquement de mitose, l'indice mitotique doit être déterminé dans au moins 1 000 cellules de chaque animal.

### *Évaluation et interprétation des résultats*

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

40. 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) l'augmentation est liée à la dose pour au moins l'un des moments de prélèvement ; et
- c) des résultats se situent à l'extérieur de la plage acceptable de données relatives aux témoins négatifs, ou des données relatives aux témoins négatifs historiques du laboratoire le cas échéant (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson).

Lorsque tous ces critères sont remplis, le produit chimique d'essai est considéré comme capable d'induire des aberrations chromosomiques dans les cellules de spermatogonies des animaux testés. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (11) (18). Les méthodes statistiques employées considèrent l'animal comme unité expérimentale.

41. 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 de données relatives aux témoins négatifs ou des données du laboratoire relatives aux témoins négatifs historiques, le cas échéant (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson).

Le produit chimique d'essai est alors considéré comme incapable d'induire des aberrations chromosomiques dans les cellules de spermatogonies de l'animal testé. Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont également disponibles dans la littérature (11) (18). Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité que la substance chimique puisse induire des aberrations chromosomiques à des stades de développement ultérieurs non étudiés, ou des mutations génétiques.

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

43. 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, en vérifiant par exemple si le résultat positif se situe en dehors de la plage acceptable des données relatives aux témoins négatifs ou des données des témoins négatifs historiques du laboratoire (19).

44. 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.

45. Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que le produit chimique d'essai est capable d'inhiber les processus mitotiques et d'induire des aberrations chromosomiques numériques (20). Une augmentation du nombre de cellules présentant des chromosomes endoredupliques peut indiquer que le produit chimique testé est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (21) (22), un mécanisme qui, bien que différent de l'inhibition des processus mitotiques, induit lui aussi des modifications du nombre de chromosomes (voir paragraphe 2). La fréquence des cellules polyploïdes et des cellules présentant des chromosomes endoredupliques doit donc être consignée séparément.

### ***Rapport d'essai***

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

#### *Résumé.*

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

- 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 ;

## 483 OECD/OCDE

- 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 ;
- 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) le cas échéant.

*Animaux d'essai :*

- espèces/souches utilisées et justification ;
- nombre et âge 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 de l'essai :*

- 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 ;
- justification du choix de la voie d'administration ;
- détails sur la préparation du produit chimique d'essai ;
- détails sur l'administration du produit chimique d'essai ;
- justification du choix des délais de sacrifices ;
- 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 ;
- description détaillée des programmes de traitement et de prélèvement et justification des choix ;
- méthode d'euthanasie ;
- méthode d'analgésie (le cas échéant) ;
- procédures d'isolement des tissus ;
- nature et concentration de l'inhibiteur du fuseau, durée du traitement ;
- méthodes de préparation des lames ;
- critères d'analyse des aberrations ;

- nombre de cellules analysées par animal ;
- critères pour conclure que l'étude est positive, négative ou équivoque.

*Résultats :*

- état de santé des animaux avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité ;
- poids corporels et poids des organes, après euthanasie (si plusieurs traitements sont utilisés, poids corporels pendant le régime de traitement) ;
- signes de toxicité ;
- indice mitotique ;
- rapport des cellules de spermatogonies en mitose à celles se trouvant en premières et secondes métaphases méiotiques, ou autre preuve d'exposition du tissu cible ;
- type et nombre d'aberrations, 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 ;
- relation dose-réponse, si possible ;
- analyses et méthodes statistiques employées ;
- données des témoins négatifs concomitants ;
- données des témoins négatifs historiques, y compris les plages, les moyennes, les écarts types, et limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson (le cas échéant), ou données publiées relatives aux témoins historiques utilisées pour déterminer l'acceptabilité des résultats de l'essai ;
- données des témoins positifs concomitants ;
- modifications de la ploïdie, le cas échéant, y compris les fréquences de polyploïdie et/ou de cellules endoredupliquées.

*Discussion des résultats.*

*Conclusions.*

**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. Ed. S. Venitt et J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
- (3) Adler, I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. et Tanaka N. (1994). Colloque International sur la Normalisation des Méthodes d'Essai de Génotoxicité. Rapport de Synthèse du Groupe de Travail sur les Essais Relatifs aux Cellules Germinales de Mammifères. Mutation Res., 312, 313-318.
- (4) Russo, A. (2000) *In Vivo* Cytogenetics : Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.
- (5) Hess, R.A., de Franca, L.R. (2008) Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In : Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng, C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.
- (6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study After Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation Res., 23(3) : 368-379. Adler I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B : Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. et Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
- (7) Cattanaach, B.M., et Pollard, C.E. (1971) Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.
- (8) Cattanaach, B.M., et Williams, C.E. (1971) A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.
- (9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.
- (10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3) : 313-324.
- (11) 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.
- (12) 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). Rapport du Groupe de Travail des British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society : Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen. , 7, 313-319.
- (13) 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.

- (14) Yamamoto, K. et Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. *Mutation Res.*, 52, 207-209
- (15) Hsu, T.C., Elder, F. et Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. *Environ. Mutagen.*, 1, 291-294.
- (16) Evans, E.P., Breckon, G., et Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, 289-294.
- (17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. et Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J.Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G., et Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In : D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.
- (19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J., Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. *Mutation Res.*, 723, 87-90.
- (20) Warr T.J., Parry E.M. et Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, *Mutation Res.*, 287, 29-46.
- (21) Huang, Y., Change, C. et Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.
- (22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells During Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. *Mutation Res.*, 119, 403-413.

## ANNEXE

### *Définitions*

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

Aberration 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.

Aberration 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, cassures et échanges.

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

Clastogène : substance induisant des aberrations chromosomiques structurales dans des populations de cellules ou d'organismes.

Diversité chromosomique : diversité des formes de chromosomes (par exemple, métacentriques, acrocentriques, etc.) et de leur taille.

Génotoxique : terme générique qualifiant tous les types de lésions de l'ADN ou des chromosomes, tels que les cassures, délétions, adduits, liaisons et modifications de nucléotides, réarrangements, mutations, aberrations chromosomiques et aneuploïdies. Tous les types d'effets génotoxiques n'entraînent pas nécessairement de mutations ou de lésions chromosomiques stables.

Indice mitotique (IM) : nombre de cellules en métaphase divisé par le nombre total de cellules dans une population ; une indication de la vitesse de prolifération cellulaire dans cette population.

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

Mitose : division du noyau cellulaire, généralement décomposée en prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase.

Mutagène : qui produit une modification héréditaire portant sur une ou plusieurs séquences de paires de bases d'ADN génique, ou sur la structure de chromosomes (aberrations chromosomiques).

Polyploidie : état multiple du nombre de chromosomes haploïde ( $n$ ), autre que le nombre diploïde (c'est-à-dire  $3n$ ,  $4n$ , etc.).