

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

Essai d'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifères

INTRODUCTION

1. L'essai d'aberration chromosomique *in vivo* est destiné à identifier les agents qui provoquent des aberrations structurales dans des cellules de moelle osseuse d'animaux, généralement des rongeurs (1)(2)(3)(4). Les aberrations structurales peuvent être de deux types : chromosomiques ou chromatidiques. Un gain de polyploïdie peut indiquer qu'une substance possède la faculté de provoquer des aberrations numériques. La majorité des mutagènes chimiques induisent des aberrations de type chromatidique, mais des aberrations chromosomiques se produisent également. Les mutations chromosomiques et les événements connexes sont à l'origine de beaucoup de maladies génétiques humaines et on a de bonnes raisons de penser que les mutations chromosomiques et les événements connexes, frappant des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, jouent un rôle dans le cancer chez l'homme et dans les systèmes expérimentaux.

2. Les définitions utilisées figurent en annexe.

CONSIDERATIONS INITIALES

3. Les rongeurs sont couramment utilisés dans cet essai. Cet essai se pratique sur la moelle osseuse, parce que c'est un tissu très vascularisé, formé d'une population de cellules au cycle rapide et faciles à prélever et traiter. D'autres espèces et tissus cibles ne font pas l'objet de la présente ligne directrice.

4. Cet essai d'aberration chromosomique se prête particulièrement bien à l'évaluation du risque mutagène, en ce sens qu'il permet de prendre en compte des facteurs de métabolisme *in vivo*, de pharmacocinétique et de processus de réparation de l'ADN. Ces facteurs peuvent cependant varier d'un animal à un autre et d'un tissu à un autre. Un essai *in vivo* sert aussi à vérifier un effet mutagène détecté sur un système *in vitro*.

5. Il ne faut pas faire appel au présent test s'il est manifeste que la substance d'essai ou un métabolite réactif n'atteindront pas le tissu cible.

PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

6. Les animaux sont exposés à la substance d'essai par une voie d'exposition appropriée et sont sacrifiés à des délais appropriés après le traitement. Avant le sacrifice, 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.

DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

Préparations

Sélection des espèces animales

7. Les rats, les souris et les hamsters chinois sont communément utilisés, bien que n'importe quelle espèce de mammifère appropriée puisse être employée. Il convient d'utiliser des animaux adultes jeunes et sains issus de souches courantes de laboratoire. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux doit être minimale et ne pas dépasser ± 20 pour cent du poids moyen de chaque sexe.

Conditions d'encagement et d'alimentation

8. La température de l'animalerie doit être de 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). L'humidité relative doit atteindre au moins 30 pour cent et de préférence ne pas dépasser 70 pour cent, sauf durant le nettoyage de la salle. Une humidité relative de 50 à 60 pour cent est idéale. On choisira un éclairage artificiel, avec un cycle de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité. Les aliments classiques pour animaux de laboratoire peuvent être utilisés, avec de l'eau potable à satiété. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne incorporation de la substance d'essai à ces derniers, lorsqu'elle est administrée dans la nourriture. Les animaux sont encagés individuellement ou par petits groupes du même sexe.

Préparation des animaux

9. Les animaux sont répartis au hasard entre les groupes témoins et les groupes de traitement. Les cages doivent être disposées de telle manière qu'il n'y ait pas d'effets dus à l'emplacement des cages. Les animaux sont marqués individuellement afin d'identification. Ils sont acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins cinq jours.

Préparation des doses

10. Les substances d'essai solides doivent être dissoutes ou mises en suspension dans des solvants ou véhicules appropriés, puis, le cas échéant, diluées avant d'être affectées au traitement des animaux. Les substances liquides peuvent être administrées directement ou après dilution. Il faut utiliser des préparations fraîches sauf si l'on dispose de données qui démontrent la stabilité des préparations dans les conditions du stockage.

Conditions expérimentales

Solvant/véhicule

11. Le solvant/véhicule ne doit pas produire d'effets toxiques aux doses utilisées ni interagir avec la substance 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.

Témoins

12. Des témoins positifs et négatifs (solvant ou véhicule) de chaque sexe doivent accompagner chaque essai. Les animaux des groupes témoins sont traités exactement comme ceux des groupes de traitement, mis à part l'administration de la substance d'essai.

13. Les témoins positifs doivent produire des aberrations chromosomiques structurales *in vivo* à des niveaux d'exposition supposés produire un accroissement détectable par rapport à la fréquence de fond. Les doses du témoin positif doivent être choisies de façon que les effets soient évidents et que l'identité des lames codées ne soit pas trahie. Le contrôle positif peut être administré par une voie différente de celle utilisée pour la substance d'essai. Il peut suffire de l'échantillonner à un seul moment. L'emploi de témoins positifs appartenant à la même classe chimique peut être envisagé, s'ils sont disponibles. Les substances suivantes sont des exemples de témoins positifs:

Substance chimique et N° CAS
Triéthylènemélatamine [n° CAS 51-18-3]
Méthanesulfonate d'éthyle [n° CAS 62-50-0]
Ethylnitrosourée [n° CAS 759-73-9]
Mitomycine C [n° CAS 50-07-7]
Cyclophosphamide [n° CAS 50-18-0]
Cyclophosphamide monohydraté [n° CAS 50-18-0; (n° CAS 6055-19-2)]

14. A chaque délai de prélèvement, il faut associer un témoin négatif, constitué uniquement du solvant ou du véhicule et testé de la même façon que la substance d'essai, sauf si des résultats obtenus antérieurement démontrent que la variabilité entre différentes espèces et la fréquence des cellules avec des aberrations chromosomiques sont acceptables. Dans le cas où un témoin négatif est échantillonné une seule fois, il convient de le faire au premier temps de prélèvement. En outre, des témoins non traités doivent aussi être inclus, à moins que des essais témoins réalisés antérieurement ou des données publiées ne démontrent que le solvant/véhicule choisi n'induit aucun effet délétère ou mutagène.

MODE OPERATOIRE**Nombre et sexe des animaux**

15. Chaque groupe traité et témoin doit comprendre au moins cinq animaux analysables pour chaque sexe. Si on dispose de données, obtenues antérieurement avec la même espèce et la même voie d'administration, qui démontrent l'absence de différences substantielles de toxicité entre sexes, il suffit de faire l'essai avec un seul sexe. Si l'exposition humaine est spécifique pour un sexe, par exemple dans le cas d'un produit pharmaceutique, des animaux du sexe approprié doivent être utilisés dans l'essai.

Programme de traitement

16. Il est préférable d'administrer la substance d'essai en une seule fois. Quand il s'agit d'administrer un grand volume, on peut le faire en deux fois, par exemple deux traitements le même

jour séparés de quelques heures. D'autres régimes de dosage sont acceptables pour autant qu'ils soient scientifiquement justifiés.

17. Les échantillons doivent être prélevés à deux moments différents au cours d'une journée à la suite du traitement. Pour les rongeurs, le premier intervalle de prélèvement se situe à 1.5 durée normale du cycle cellulaire (généralement de 12 à 18 heures) après le traitement. Etant donné que le temps requis par l'absorption et la métabolisation de la substance d'essai ainsi que son effet sur la cinétique du cycle cellulaire peuvent influencer sur le moment optimal pour la détection des aberrations, on recommande d'effectuer un autre prélèvement 24 heures après le premier. Si l'on applique des programmes de traitement qui couvrent plus d'une journée, le temps de prélèvement devrait être situé à 1.5 durée normale du cycle cellulaire après la fin du traitement.

18. Avant le sacrifice, les animaux reçoivent une dose appropriée d'un inhibiteur du fuseau (par exemple le Colcemid® ou la colchicine) par injection intrapéritonéale. Les prélèvements sont effectués après un intervalle approprié, qui est de 3 à 5 heures pour la souris et de 4 à 5 heures pour le hamster chinois. Les cellules sont prélevées de la moelle osseuse et analysées pour détecter les aberrations chromosomiques.

Niveaux de doses

19. Si l'on procède à une étude d'évaluation d'ordre de grandeur, parce que des données fiables ne sont pas disponibles, elle 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 (5). En cas de toxicité on applique trois niveaux de doses pour le premier prélèvement. Ces niveaux de doses doivent recouvrir un domaine allant d'une toxicité nulle ou faible à une toxicité maximale. Pour les prélèvements ultérieurs seule la dose la plus élevée est utilisée. Celle-ci est définie comme celle qui produit des signes de toxicité tels qu'ils font supposer que des doses plus fortes, administrées suivant le même régime de dosage, seraient létales. Les substances possédant une activité biologique spécifique à des doses faibles et non toxiques (comme les hormones et les mitogènes) peuvent faire exception aux critères d'établissement des doses et doivent être évaluées au cas par cas. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme étant celle qui produit certains indices de toxicité dans la moelle osseuse (par exemple une diminution de plus de 50% de l'indice mitotique).

Essai limite

20. Si un essai mené avec au moins 2000 mg/kg de poids corporel, en une seule dose ou en deux doses administrées le même jour, n'engendre aucun effet toxique observable et si la toxicité est improbable d'après les données se rapportant à des composés de structure voisine, on peut considérer qu'une étude complète avec trois niveaux de doses n'est pas nécessaire. Dans les études de plus longue durée, la dose limite est de 2000 mg/kg de poids corporel par jour dans le cas d'un traitement durant jusqu'à 14 jours et de 1000 mg/kg de poids corporel/jour pour les études plus longues. Suivant l'importance de l'exposition humaine probable on peut envisager d'utiliser des doses plus fortes dans l'essai limite.

Administration des doses

21. La substance d'essai est généralement administrée par gavage à l'aide d'une sonde gastrique ou d'une canule de tubage adaptée, ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'exposition sont acceptables lorsqu'elles peuvent être justifiées. 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 pas dépasser 2 ml/100 g de poids corporel. Une justification doit être fournie si des volumes plus importants sont administrés. Il convient de minimiser la variation du volume administré en ajustant la concentration à

tous les niveaux de doses, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets deviennent généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

Préparation des chromosomes

22. La moelle osseuse est extraite immédiatement après le sacrifice, exposée à une solution hypotonique et fixée. Les cellules sont alors étalées sur des lames et colorées.

Analyse

23. L'indice mitotique sert de mesure de la cytotoxicité et il doit être déterminé dans 1000 cellules ou davantage pour chaque animal traité, témoins positifs y compris, et pour chaque animal non traité des témoins négatifs.

24. On doit analyser au moins 100 cellules chez chaque animal. Ce nombre peut être réduit lorsque les aberrations observées sont nombreuses. Toutes les lames, y compris celles des témoins négatifs et positifs, doivent être codées indépendamment avant l'analyse au microscope. Le procédé de fixation provoque souvent la rupture d'une certaine fraction des cellules en métaphase entraînant une perte de chromosomes. Pour cette raison, toutes les cellules examinées doivent contenir un nombre de centromères égal à $2n \pm 2$.

RESULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

25. Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. L'unité expérimentale est l'animal. Pour chaque animal, il faut donner le nombre de cellules examinées et évaluer le nombre d'aberrations par cellule ainsi que le pourcentage de cellules présentant une (des) aberration(s) structurale(s). 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 sont notées séparément et rapportées, mais ne sont généralement pas incluses dans la fréquence totale des aberrations. S'il n'y a pas de différence de réponse entre sexes, les données des deux sexes peuvent être combinées dans l'analyse statistique.

Evaluation et interprétation des résultats

26. Plusieurs critères permettent de déterminer si un résultat est positif, notamment un accroissement, lié à la dose, du nombre relatif de cellules présentant des aberrations ou une augmentation nette du nombre de cellules présentant des aberrations dans un seul groupe de traitement à un seul temps de prélèvement. En premier lieu il s'agit de prendre en considération la pertinence biologique des résultats. L'évaluation des résultats peut s'appuyer sur des méthodes statistiques (6) mais la signification statistique ne doit pas être le seul facteur de décision. Des résultats ambigus doivent être clarifiés par d'autres essais faits de préférence avec des conditions expérimentales modifiées.

27. Une augmentation du nombre de cellules polyploïdes peut signifier que la substance d'essai est capable d'induire des aberrations numériques. Une augmentation du nombre de cellules ayant des chromosomes endoredupliqués peut indiquer que la substance d'essai est capable d'inhiber la progression du cycle cellulaire (7)(8).

28. Si les résultats obtenus avec une substance d'essai ne répondent pas aux critères donnés ci-dessus il faut conclure que la substance en question n'est pas mutagène dans cet essai.

29. Quoique la plupart des essais donnent des résultats clairement positifs ou négatifs, il arrive occasionnellement que l'ensemble des résultats d'un essai n'autorise pas un jugement catégorique sur l'activité de la substance étudiée. Ces résultats équivoques ou discutables peuvent survenir indépendamment du nombre de fois que l'essai a été répété.

30. Des résultats positifs obtenus dans un essai d'aberration chromosomique *in vivo* indiquent qu'une substance induit des aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de l'espèce testée. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, la substance d'essai n'induit pas d'aberrations chromosomiques dans la moelle osseuse de l'espèce testée.

31. La possibilité que la substance d'essai ou ses métabolites n'atteignent pas le système circulatoire ou spécifiquement le tissu cible (toxicité systémique) doit être discutée.

Rapport d'essai

32. Le rapport d'essai doit fournir les informations suivantes :

Substance d'essai :

- données d'identification et n° CAS, s'il est connu ;
- état physique et pureté ;
- propriétés physico-chimiques qui sont importantes pour la conduite de l'étude ;
- stabilité de la substance d'essai, si elle est connue.

Solvant/véhicule :

- justification du choix du véhicule ;
- solubilité et stabilité de la substance dans le solvant ou véhicule, si elles sont connues.

Animaux d'expérience :

- espèce et souche utilisées ;
- nombre, âge et sexe des animaux ;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc. ;
- poids individuel des animaux au début de l'essai, y compris la gamme des poids, l'écart moyen et pondéré dans chaque groupe.

Conditions expérimentales :

- données des témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule) ;
- données obtenues dans l'étude d'évaluation de grandeur, si elle a été faite ;
- justification du choix des doses employées ;
- détails concernant la formulation de la substance d'essai ;
- détails concernant l'administration de la substance d'essai ;
- justification du choix de la voie d'administration ;
- méthodes pour vérifier que la substance a atteint la circulation générale ou le tissu cible, le cas échéant ;
- conversion de la concentration de la substance d'essai (ppm) dans l'eau de boisson ou la nourriture en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu ;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau ;
- description détaillée des programmes de traitement et de prélèvement ;

- méthodes de détermination de la toxicité ;
- nature et concentration de l'inhibiteur du fuseau, durée du traitement ;
- méthodes de préparation des lames ;
- critères de comptage des aberrations ;
- nombre de cellules analysées par animal ;
- critères de décision concernant les études positives, négatives et ambiguës.

Résultats :

- signes de toxicité ;
- indice mitotique ;
- 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 ;
- changements intervenus dans la ploïdie, le cas échéant ;
- relation dose-réponse, si possible ;
- analyses statistiques, le cas échéant ;
- données sur les essais témoins négatifs menés parallèlement à l'essai ;
- données sur les essais témoins négatifs menés antérieurement à l'essai, y compris les ordres de grandeur, les moyennes et les écarts types ;
- données sur les essais témoins positifs menés parallèlement à l'essai.

Discussion des résultats.

Conclusion.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In : Mutagenicity Testing : a Practical Approach. S. Venitt and J. M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.
- (2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F., and Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays : Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res.*, 189, 157-165.
- (3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. In : D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res.*, 312, 305-312.
- (5) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group : Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.

- (6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G., and Savage, J. R. K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In : UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, D. J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
- (7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, 403-413.
- (8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.

ANNEXEDEFINITIONS

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.

Endoreduplication : un processus dans lequel le noyau, après une phase S de réplication d'ADN, n'entre pas en mitose mais recommence une phase S. Il en résulte des chromosomes avec 4, 8, 16, chromatides.

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

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

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

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 modifications changes intrachromosomiques ou interchromosomiques.