



**« Toxicologie Génétique : Essai de Translocation
Héréditaire chez la Souris »****1. INTRODUCTION**• Connaissances requises

- Nature de la substance à tester solide, liquide, gaz ou vapeur
- Identification chimique de la substance à tester
- Degré de pureté (impuretés) de la substance à tester
- Caractéristiques de solubilité
- Point de fusion/d'ébullition
- pH (le cas échéant)
- Données relatives à la tension de vapeur (si elles sont disponibles)

• Documents de référence

Il n'existe pas de normes internationales à ce sujet.

2. MÉTHODE**A. INTRODUCTION**

L'essai de translocation héréditaire chez la souris décèle des changements chromosomiques structuraux et numériques au niveau des cellules germinales de mammifères tels qu'ils sont mis en évidence dans la descendance de première génération.

• Principe de la méthode

Les types de changements chromosomiques détectés sont des translocations réciproques et, si la descendance femelle est incluse, la perte du chromosome X. Les porteurs de translocations et les femelles XO présentent une fertilité réduite permettant la sélection d'une descendance F_1 en vue d'une analyse cytogénétique.

Une stérilité totale est due à certains types de translocations (autosome X et type c/t). Les translocations sont observées cytogénétiquement dans les cellules méiotiques en diacinèse-métaphase I des individus mâles, qu'ils s'agisse de mâles F_1 ou de fils de femelles F_1 . Les femelles XO sont identifiées cytogénétiquement par la présence de 39 chromosomes seulement dans des mitoses de la moelle osseuse.

B. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

• Préparations

Substance à étudier

Quand cela est possible, les substances à étudier sont dissoutes dans une solution saline isotonique. Si elles sont insolubles dans l'eau, elles sont dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés. Le véhicule utilisé ne doit pas interférer avec la substance à étudier et ne pas produire d'effets toxiques. On utilise des solutions fraîchement préparées de la substance à étudier.

Animaux d'expérience

Pour faciliter l'élevage et la vérification cytologique, ces études sont effectuées avec des souris. Aucune souche spécifique de souris n'est requise. Toutefois, la taille moyenne d'une portée de la souche utilisée devra être supérieure à 8 et être relativement constante. Des animaux ayant atteint leur maturité sexuelle seront utilisés.

Nombre d'animaux

Le nombre d'animaux nécessaires dépend de la fréquence de translocations spontanées ainsi que du taux minimal d'induction requis pour un résultat positif.

L'essai consiste habituellement en une analyse de la descendance mâle F_1 . L'essai nécessite l'utilisation de beaucoup d'animaux, de l'ordre de 500 mâles F_1 par dose.

• Conditions expérimentales

Témoins

Des résultats de témoins adéquats provenant d'épreuves réalisées simultanément et de témoins historiques doivent être disponibles. S'il existe des résultats acceptables de témoins positifs provenant d'expériences récemment effectuées dans le même laboratoire, ces résultats peuvent être utilisés en lieu et place de témoins positifs simultanés.

Niveau de dose

Une seule dose est testée. Il s'agit habituellement de la dose maximale associée à la production d'effets toxiques minimaux mais n'affectant pas le comportement reproducteur ou la survie. Pour établir une relation dose/réponse, deux autres doses plus faibles sont nécessaires. Dans

« Toxicologie Génétique : Essai de Translocation Héréditaire chez la Souris »

le cas de substances non toxiques on devrait administrer la substance à étudier à une dose unique allant jusqu'à 5 g/kg, ou à des doses de 1 g/kg/jour si un régime de traitements répétés est utilisé. Si ces traitements s'avèrent impraticables on devrait utiliser les doses maximales tolérées.

Voies d'administration

Les voies d'administration sont habituellement l'intubation orale ou l'injection intrapéritonéale. D'autres voies d'administration peuvent être appropriées. Les données obtenues seront d'autant plus utiles dans l'évaluation des risques que la voie d'administration aura été choisie en fonction des conditions de l'exposition de l'homme.

• Exécution de l'essai

Traitement et accouplement

Deux programmes de traitement existent. L'administration unique de la substance d'essai est la méthode la plus fréquemment utilisée. La substance à étudier peut également être administrée 7 jours sur 7 pendant 35 jours. Le nombre d'accouplements après traitement est déterminé par le programme de traitement et sera tel que tous les stades des cellules germinales traitées soient impliqués. A l'issue de la période d'accouplement, les femelles sont placées dans des cages individuelles. Lorsqu'elles ont mis bas, la date, la taille de la portée et le sexe des jeunes sont enregistrés. Toute la descendance mâle est sevrée et toute la descendance femelle est écartée à moins d'être incluse dans l'expérience.

Recherche des hétérozygotes de translocation

On peut utiliser une des deux méthodes suivantes :

- analyse de la fertilité de la descendance F_1 et vérification ultérieure d'éventuels porteurs de translocations par analyse cytogénétique.
- analyse cytogénétique de tous les mâles F_1 sans sélection préalable par vérification de la fécondité.

a) analyse de la fertilité

La réduction de fertilité d'un individu F_1 peut être déterminée en observant la taille de la portée et/ou en analysant le contenu utérin des femelles qui lui sont accouplées.

**« Toxicologie Génétique : Essai de Translocation
Héréditaire chez la Souris »**

Il y a lieu de fixer les critères de détermination de la fertilité normale et réduite de la souche de souris utilisés.

Observation de la taille de la portée

Les mâles F_1 à tester sont placés dans des cages individuelles avec des femelles provenant soit de la même expérience soit de la colonie. Les cages sont inspectées quotidiennement à partir du 18^{ème} jour qui suit l'accouplement. La taille de la portée et le sexe de la descendance F_2 sont enregistrés au moment de la naissance et les jeunes sont ensuite éliminés. Si la descendance femelle F_1 est testée, les descendants F_2 provenant de petites portées sont conservés en vue d'une analyse ultérieure. Les femelles porteuses de translocation font l'objet d'une vérification par analyse cytogénétique d'une translocation dans n'importe lequel de leurs descendants mâles. Les femelles XO sont identifiées par la modification du rapport des sexes dans leur descendance, rapport qui passe de 1:1 à 1:2 mâles/femelles. Dans une méthode séquentielle, les animaux F_1 normaux ne font pas l'objet d'une autre vérification si la première portée F_2 atteint ou dépasse une valeur normale prédéterminée, sinon une deuxième ou une troisième portée F_2 sont observées. Les animaux F_1 qui ne peuvent pas être classés comme normaux après que l'on ait observé jusqu'à trois portées F_2 sont soit soumis à un nouveau contrôle par le biais d'une analyse du contenu utérin de femelles qui leur sont accouplées soit directement soumis à une analyse cytogénétique.

Analyse du contenu utérin

La réduction de la taille des portées chez les porteurs de translocation est due à la mort des embryons, de sorte qu'un grand nombre d'implants morts indique la présence d'une translocation chez l'animal soumis au test. Chaque mâle F_1 à tester est accouplé à 2 ou 3 femelles. On constate la conception en examinant les femelles tous les matins afin de déceler la présence de bouchons vaginaux. Les femelles sont sacrifiées 14 à 16 jours plus tard et le nombre d'implants vivants et morts présents dans leur utérus est enregistré.

b) Analyse cytogénétique

Les préparations de testicules sont effectuées par la méthode de séchage à l'air. Les porteurs de translocations sont identifiés par la présence de configurations multivalentes en diacinèse

**« Toxicologie Génétique : Essai de Translocation
Héréditaire chez la Souris »**

métaphase I dans les spermatocytes primaires. L'observation d'au moins 2 cellules présentant une association multivalente constitue la preuve nécessaire que l'animal testé est porteur d'une translocation.

Si aucune sélection par analyse de fécondité n'a été effectuée, tous les mâles F_1 sont soumis à un examen cytogénétique. Un minimum de 25 diacynèses métaphases I par mâle doivent être analysées au microscope. L'examen des métaphases mitotiques, des spermatogonies ou de la moelle osseuse est requise pour les mâles F_1 ayant de petits testicules et présentant un arrêt méiotique avant la diacynèse ou pour les femelles F_1 suspectées d'être XO. La présence d'un chromosome inhabituellement long et/ou court dans 10 cellules est la preuve d'une translocation particulière entraînant la stérilité mâle (type c/t). Quelques translocations X-autosomes provoquant la stérilité du mâle peuvent uniquement être identifiées par une analyse des bandes de chromosomes mitotiques. La présence de 39 chromosomes dans 10 mitoses sur 10 est la preuve d'un état XO chez une femelle.

3. RÉSULTATS ET RAPPORT

- Traitement des résultats

Les résultats sont présentés sous forme de tableaux.

La taille moyenne des portées et le rapport entre les sexes sont enregistrés à la naissance et au sevrage pour chaque période d'accouplement.

Lors de l'évaluation de la fertilité des animaux de F_1 , la taille moyenne des portées issues de tous les accouplements normaux ainsi que la taille individuelle des portées issues d'animaux F_1 porteurs de translocation sont présentées. En ce qui concerne l'analyse du contenu utérin, le nombre moyen d'implants vivants et morts issus d'accouplements normaux et le nombre d'implants vivants et morts pour chaque accouplement de porteurs de translocation F_1 sont notés.

Lors de l'analyse cytogénétique de la diacynèse- métaphase I, le nombre et les différents types de configurations multivalentes et le nombre total de cellules sont relevés pour chaque porteur de translocation.

Pour les individus stériles F_1 , le nombre total d'accouplements et la durée de la période d'accouplement sont indiqués. Le poids des testicules et les détails de l'analyse cytogénétique sont indiqués.

« Toxicologie Génétique : Essai de Translocation Héréditaire chez la Souris »

Pour les femelles XO, on indique la taille moyenne de la portée, le rapport entre les sexes dans la descendance F_2 , ainsi que les résultats de l'analyse cytogénétique. Si d'éventuels porteurs de translocation F_1 sont présélectionnés par des tests de fertilité, les tableaux mentionneront combien parmi eux ont été confirmés comme étant des hétérozygotes de translocation. Les résultats seront évalués par des méthodes statistiques adéquates.

- Evaluation des résultats

Il existe plusieurs critères permettant de déterminer un résultat positif. L'un d'entre eux consiste en une augmentation statistiquement significative du nombre de translocations observées pour au moins un des points de l'essai.

Un autre critère peut être basé sur la détection d'une augmentation du nombre de translocations observées de façon statistiquement significative et proportionnelle à la dose.

Une substance à étudier est considérée comme non mutagène dans ce système si elle n'entraîne ni une augmentation statistiquement significative et reproductible du nombre des translocations pour l'un quelconque des points de l'essai, ni une augmentation du nombre des translocations, d'une façon statistiquement significative et proportionnelle à la dose.

- Rapport

Le rapport d'essai devrait comporter les informations suivantes :

- souche de souris, âge des animaux, poids des animaux traités,
- nombre d'animaux parents de chaque sexe dans les groupes traités et témoins,
- témoins simultanés et données historiques, le cas échéant,
- conditions d'essai, description détaillée du traitement, doses, solvants,
- programme d'accouplement,
- nombre et sexe des jeunes par femelle, nombre et sexe des jeunes élevés en vue d'une analyse de translocation,
- moment et critères de l'analyse de translocation,
- nombre et description détaillée des porteurs de translocation, y compris données relatives à l'élevage et au contenu utérin, si possible,

**« Toxicologie Génétique : Essai de Translocation
Héréditaire chez la Souris »**

- méthodes cytogénétiques et détails de l'analyse microscopique, de préférence avec clichés,
- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

4. BIBLIOGRAPHIE

1. I.-D. Adler, The cytogenetic heritable translocation test., *Biol. Zbl.* 97, 441-451 (1978).
2. R. Albanese, J. Topham, E. Evans, G. Clave et C. Tease, Mammalian germ cell cytogenetics, dans *Report of the UKEMS Subcommittee on guidelines for mutagenicity testing*, Part II, pp. 145-172 (1984).
3. B.M. Cattnach, The heritable translocation test in mice, dans *Cytogenetic Assays of Environmental Mutagens* (édité par T.S. Hsu), pp. 289-321, Allenheld Osman (1982).
4. W. Generoso, K.T. Caen, S. Hoff et D.G. Gosslee, Heritable translocations, dans *Chemical Mutagens : Principles and methods for their detection* (édité par A. Hollaender), vol. 5, pp. 55-77, Plenum Press, New York (1978).
5. W. Generoso, J.B. Bishop, D.G. Gosslee, G.W. Newell, C.-J. Sheu et E. von Halle, Heritable translocation test in mice, *Mutat. Res.* 26, 191-215 (1980).
6. A. Léonard et I.-D. Adler, Test for heritable translocations in male mammals, dans *Handbook on Mutagenicity Test procedures* (édité par B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols et C. Ramel), pp. 485-494, Elsevier, Amsterdam (1984).