

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

Test du Micronoyau sur Érythrocytes de Mammifères

INTRODUCTION

1. Les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques, de l'évolution des exigences réglementaires et de considérations relatives au bien-être des animaux. La Ligne directrice 474 originale a été adoptée en 1983. En 1997, elle a été remplacée par une version révisée sur la base des avancées scientifiques réalisées jusqu'alors. La présente version modifiée de la ligne directrice reflète les connaissances scientifiques acquises après plus de trente années d'expérience de cet essai et de l'interprétation des données, et tient compte en particulier des avancées réalisées en matière de technologies d'analyse automatique et des possibilités d'intégrer ou de combiner cet essai à d'autres études générales de toxicité ou de génotoxicité. Elle s'inscrit dans une série de lignes directrices sur la toxicologie génétique. Un document contenant des éléments d'information concis sur les essais de toxicologie génétique ainsi qu'un aperçu des récents changements qui ont été apportés à ces Lignes directrices a été développé (1).

2. Ce test du micronoyau pratiqué *in vivo* chez les mammifères se prête particulièrement bien à l'évaluation de la génotoxicité, car, malgré des variations entre les espèces, les facteurs du métabolisme *in vivo*, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN sont actifs et contribuent aux réponses. Le test est également considéré comme utile pour explorer plus avant un effet génotoxique détecté dans un système *in vitro*.

3. Le test du micronoyau *in vivo* est pratiqué chez des mammifères en vue de détecter des lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes résultant de l'action d'une substance d'essai. Il évalue la formation de micronoyaux dans des érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse ou dans les cellules du sang périphérique d'animaux, généralement des rongeurs.

4. Le test du micronoyau a pour but d'identifier les substances chimiques qui engendrent des lésions cytogénétiques induisant la formation de micronoyaux contenant des fragments de chromosomes retardataires ou des chromosomes entiers.

5. Lorsqu'un érythroblaste de moelle osseuse se transforme en érythrocyte immature (parfois désigné sous le terme d'érythrocyte polychromatique, ou de réticulocyte), le noyau principal est expulsé et les éventuels micronoyaux qui se sont formés peuvent subsister dans le cytoplasme. La visualisation ou la détection des micronoyaux dans ces cellules est facilitée par l'absence de noyau principal. Un accroissement de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés chez les animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique structurale ou numérique induite.
6. Les érythrocytes micronucléés nouvellement formés sont identifiés et dénombrés, une fois colorés, par examen visuel au microscope ou par analyse automatique. L'utilisation d'une plateforme d'analyse automatique facilite considérablement le dénombrement d'un nombre suffisant d'érythrocytes immatures dans le sang périphérique ou la moelle osseuse d'animaux adultes. Ce type de plateforme constitue une alternative acceptable à l'évaluation manuelle (2). D'après des études comparatives, de telles méthodes, couplées à l'utilisation de normes d'étalonnage idoines, offrent une reproductibilité et une sensibilité inter-laboratoires et intra-laboratoire supérieures aux performances de l'examen manuel au microscope (3) (4). Parmi les systèmes automatisés pouvant mesurer la fréquence des érythrocytes micronucléés, on peut citer les cytomètres en flux (5), les plateformes d'analyse d'images (6) (7) et les cytomètres à balayage laser (8).
7. Bien que cela ne fasse habituellement pas partie de l'essai, les fragments de chromosomes peuvent être distingués des chromosomes entiers d'après un certain nombre de critères. Ceux-ci comprennent la détection de la présence ou de l'absence de kinétochore ou d'ADN centromérique, tous deux étant caractéristiques d'un chromosome intact. L'absence de kinétochore ou d'ADN centromérique indique que le micronoyau ne contient que des fragments de chromosomes, tandis que la présence de l'un de ces éléments signe une perte chromosomique.
8. Les définitions des termes employés figurent à l'annexe 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

9. La moelle osseuse de jeunes rongeurs adultes est le tissu cible des lésions génétiques dans le cadre de cet essai, les érythrocytes étant produits dans ce tissu. Le comptage des érythrocytes immatures micronucléés dans le sang périphérique peut aussi être effectué chez d'autres espèces de mammifères qui ont démontré une sensibilité suffisante pour permettre la détection de substances chimiques provoquant des aberrations chromosomiques structurales ou numériques dans ces cellules (par induction de micronoyaux dans les érythrocytes immatures), et à condition que ce choix soit justifié sur le plan scientifique. La fréquence des érythrocytes immatures micronucléés est le principal effet mesuré. Il est également possible de mesurer la fréquence des érythrocytes matures micronucléés dans le sang périphérique chez les espèces ne présentant pas une forte sélection splénique contre les cellules micronucléées et lorsque les animaux sont traités en continu pendant une période supérieure à la durée de vie d'un érythrocyte chez l'espèce concernée (par exemple, quatre semaines au moins chez la souris).
10. Cet essai n'est pas pertinent s'il est prouvé que la/les substance(s) chimique(s) d'essai, ou leur(s) métabolite(s), n'atteindront pas le tissu cible.
11. Avant d'utiliser la Ligne directrice sur un mélange pour générer des données avec pour objectif recherché l'application réglementaire, on considérera si, et si oui pourquoi, elle peut fournir des résultats adéquats dans cet objectif. De telles considérations ne sont pas nécessaires quand les exigences réglementaires stipulent que le mélange doit être testé.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE D'ESSAI

12. Les animaux sont exposés au produit chimique d'essai par une voie d'exposition idoine. Si l'on utilise la moelle osseuse, les animaux sont euthanasiés au(x) moment(s) approprié(s) après le traitement ; la moelle est extraite, préparée sur des lames et colorée (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Lorsqu'on utilise le sang périphérique, ce dernier est prélevé au(x) moment(s) approprié(s) après le traitement ; les préparations sont ensuite réalisées et colorées (12) (16) (17) (18). Lors d'une administration aiguë du traitement, il importe d'effectuer le prélèvement de moelle osseuse ou de sang périphérique à un moment où l'induction d'érythrocytes immatures micronucléés par le traitement peut être détectée. Dans le cas d'un prélèvement de sang périphérique, un laps de temps suffisant doit s'être écoulé pour que ces éléments apparaissent dans la circulation sanguine. Les préparations sont analysées en vue de la détection de micronoyaux, par visualisation directe à l'aide d'un microscope, par analyse d'image, par cytométrie en flux ou par cytométrie à balayage laser.

VÉRIFICATION DES COMPÉTENCES DU LABORATOIRE**Épreuves de compétence**

13. Afin d'établir qu'il possède une expérience suffisante pour mener à bien l'essai avant de l'utiliser en routine, le laboratoire doit avoir démontré sa capacité à reproduire les résultats attendus d'après les données publiées (17) (19) (20) (21) (22) concernant les fréquences de micronoyaux avec un minimum de deux produits chimiques témoins positifs (y compris des réponses faibles induites par des doses faibles de témoins positifs) tels que ceux énumérés au tableau 1, et avec des témoins de véhicule/solvant compatibles (voir paragraphe 26). Les doses utilisées dans le cadre de ces expériences doivent produire des augmentations reproductibles qui sont fonction de la dose administrée, et démontrer la sensibilité et la plage dynamique du système d'essai sur le tissu en question (moelle osseuse ou sang périphérique) ; la méthode d'analyse retenue doit être celle qui sera employée par le laboratoire. Cette exigence ne s'applique pas aux laboratoires possédant déjà une expérience, c'est-à-dire qui disposent d'une base de données historiques telle que définie aux paragraphes 14 à 18.

Données des témoins historiques

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

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

15. Lors de l'acquisition initiale de données en vue d'établir une distribution des témoins négatifs historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent être cohérentes avec les données publiées, lorsqu'elles existent. Puis, à mesure que de nouvelles données expérimentales viennent étoffer la plage de distribution des témoins historiques, les données des témoins négatifs concomitants doivent idéalement se situer dans les limites de contrôle à 95 % de cette distribution. La base des données historiques du laboratoire relatives aux témoins négatifs doit être statistiquement robuste pour permettre au laboratoire d'évaluer la distribution de ses données des témoins négatifs. La littérature suggère qu'un minimum de 10 expériences peut-être nécessaire, sachant qu'il serait préférable d'en compter au moins 20, réalisées dans des conditions expérimentales similaires. Les laboratoires doivent avoir recours à des méthodes de contrôle de la qualité telles que des graphiques statistiques (cartes C ou cartes X-barre, par exemple (23)), afin de déterminer la variabilité de leurs données et de démontrer leur maîtrise de la méthodologie. On trouve dans la littérature (24) d'autres recommandations sur la façon de constituer et

d'utiliser ces données historiques (critères d'inclusion et d'exclusion des données dans la base et critères d'acceptabilité pour une expérimentation donnée).

16. Si, au cours des expériences visant à vérifier sa compétence (comme décrit au paragraphe 13), le laboratoire n'a pas réalisé un nombre suffisant d'expériences pour établir une distribution des témoins négatifs statistiquement robuste (voir paragraphe 15), on peut accepter que la distribution soit construite au cours des premiers tests de routine. Cette approche devra suivre les recommandations établies dans la littérature (24) et les résultats des témoins négatifs obtenus lors de ces expériences devront être cohérents avec les données publiées des témoins négatifs.

17. Toute modification du protocole expérimental doit être étudiée à la lumière de ses répercussions sur la cohérence des nouvelles données avec celles de la base de données des témoins historiques. Seules des incohérences majeures justifient l'établissement d'une nouvelle base de données des témoins historiques, après confirmation de la différence de distribution des données par des experts (voir paragraphe 15). Lors de la constitution de cette nouvelle base de données, le laboratoire n'a pas forcément besoin d'une base de données de témoins négatifs complète pour autoriser la conduite d'un essai, à condition qu'il puisse apporter la preuve que les valeurs des témoins négatifs concomitants sont cohérentes avec la précédente base de données ou avec les données publiées correspondantes.

18. Les données des témoins négatifs désignent l'incidence des érythrocytes immatures micronucléés chez chaque animal. Les témoins négatifs concomitants se situent idéalement dans les limites de contrôle à 95 % de la distribution des données historiques des témoins négatifs contenues dans la base de données du laboratoire. Lorsque les données des témoins négatifs concomitants se situent en dehors des limites de contrôle à 95 %, leur inclusion dans la distribution des témoins historiques peut être acceptable, à condition que ces données ne soient pas exagérément extrêmes et qu'il soit prouvé que le système d'essai est « sous contrôle » (voir paragraphe 15) et qu'il n'y a pas eu de défaillance technique ou humaine.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI

Préparations

Sélection des espèces animales

19. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains issus de souches courantes de laboratoire. On pourra choisir des souris, des rats, ou toute autre espèce de mammifère appropriée. Si l'examen porte sur le sang périphérique, il doit être établi que l'élimination par la rate des cellules micronucléées ne compromet pas la détection des micronoyaux induits chez l'espèce sélectionnée. Cela a été clairement démontré pour le sang périphérique chez la souris et le rat (2). L'utilisation d'une espèce autre que le rat ou la souris doit être scientifiquement justifiée dans le rapport. Si des animaux autres que des rongeurs sont utilisés, il est recommandé que la mesure des micronoyaux induits soit intégrée à un autre essai de toxicité pertinent.

Conditions d'encagement et d'alimentation des animaux

20. Pour les rongeurs, la température de l'animalerie doit être maintenue à 22°C (±3°C). L'humidité relative, qui est idéalement de 50 à 60 %, doit atteindre au moins 40 % et de préférence ne pas dépasser 70 %, sauf durant le nettoyage du local. L'éclairage est artificiel, la séquence d'éclairage étant de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire des animaux est le régime classique de laboratoire avec eau potable à volonté. Le choix des aliments peut être influencé par la nécessité d'assurer une bonne

incorporation du produit chimique dans la nourriture si l'administration se fait par cette voie. Les rongeurs sont mis en cage par petits groupes d'individus de même sexe (cinq au maximum par cage) recevant le même traitement, si aucun comportement agressif n'est à craindre, de préférence dans des cages à fond plein dotées d'un enrichissement environnemental approprié. Les animaux peuvent être encagés individuellement si cela est justifié du point de vue scientifique.

Préparation des animaux

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

Préparation des doses

22. 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 :

23. 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 historiques ou publiées significatives montrant qu'aucun micronoyau ou effet délétère n'est induit par un solvant/véhicule inhabituel sélectionné, une étude initiale devra être réalisée afin d'établir l'acceptabilité du témoin pour le solvant/véhicule.

Témoins*Témoins positifs*

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

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

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

Substance chimique et n° CAS
Méthanesulfonate d'éthyle [n° CAS 62-50-0]
Méthanesulfonate de méthyle [n° CAS 66-27-3]
Ethylnitrosourée [n° CAS 759-73-9]
Mitomycine C [n° CAS 50-07-7]
Cyclophosphamide (monohydratée) [n° CAS 50-18-0 (n° CAS 6055-19-2)]
Triéthylènemélatamine [n° CAS 51-18-3]
Colchicine [n° CAS 64-86-8] ou vinblastine [n° CAS 865-21-4] – comme aneugènes

Témoins négatifs

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

27. Si le sang périphérique est utilisé, un échantillon prélevé avant le traitement peut aussi tenir lieu de témoin négatif pour les études de courte durée, lorsque les résultats sont conformes aux valeurs de la base de données des témoins historiques du laboratoire. Il a été démontré chez le rat que le prélèvement de faibles volumes (par exemple, inférieurs à 100 µl/jour) avant le traitement avait un impact minime sur la fréquence de fond des micronoyaux (25).

MODE OPÉRATOIRE

Nombre et sexe des animaux

28. En règle générale, la réponse des micronoyaux est similaire chez les animaux mâles et femelles (26), et la plupart des études pourrait donc être réalisée sur l'un ou l'autre des deux sexes. Des données démontrant des différences significatives entre les mâles et les femelles (par exemple sur le plan de la toxicité systémique, du métabolisme, de la biodisponibilité de la toxicité sur la moelle osseuse, etc. comprenant également des données provenant par exemple d'études de détermination des doses) encouragent l'utilisation des deux sexes. Il peut donc être plus approprié dans ce cas de mener une étude sur les deux sexes, par exemple dans le cadre d'une étude de toxicité à doses répétées. Il pourrait être judicieux de recourir à un plan factoriel en cas d'utilisation des deux sexes. Des précisions sur cette méthode d'analyse des données sont fournies à l'annexe 2.

29. La taille des groupes au début de l'étude doit permettre de disposer dans chaque groupe d'au moins cinq animaux analysables du même sexe ou de chaque sexe si les deux sont utilisés. Si l'exposition humaine est spécifique pour un sexe, par exemple dans le cas de certains produits pharmaceutiques, l'essai sera pratiqué sur des animaux du sexe approprié. À titre d'information concernant le nombre maximum d'animaux généralement requis, une étude sur moelle osseuse conduite selon les paramètres établis au paragraphe 37, impliquant trois groupes de traitement et des groupes de témoins négatifs et de témoins positifs concomitants (chaque groupe étant composé de cinq animaux du même sexe) nécessitera entre 25 et 35 animaux.

Niveaux de dose

30. 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 (27). Elle devra avoir pour objectif de déterminer la dose maximale tolérée (DMT), définie comme la dose la plus élevée qui sera tolérée sans faire apparaître de toxicité limitante, dans le cadre de la durée de l'étude (par exemple, induisant une baisse du poids corporel ou une cytotoxicité du système hématopoïétique, mais ne provoquant pas la mort ou des signes de douleur, de souffrance ou de détresse imposant de sacrifier les animaux (28)).

31. La dose la plus élevée peut aussi être définie comme la dose qui produit une toxicité dans la moelle osseuse (par exemple une diminution de plus de 50 % de la proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes dans la moelle osseuse ou le sang périphérique, sans que cette proportion devienne inférieure à moins 20 % de la valeur témoin). Toutefois, l'analyse des cellules positives au marqueur CD71 dans la circulation sanguine périphérique (par cytométrie en flux) révèle que cette fraction d'érythrocytes immatures très jeunes répond plus rapidement aux substances toxiques que la cohorte plus importante d'érythrocytes immatures positifs à l'ARN. Par conséquent, la toxicité peut apparaître supérieure dans le cadre d'expériences prévoyant une exposition aiguë suivie de l'examen des érythrocytes immatures positifs au marqueur CD71 par rapport aux dispositifs d'essai qui recensent les érythrocytes immatures en fonction de leur contenu ARN. Pour cette raison, lorsque l'expérience prévoit

cinq jours de traitement ou moins, la dose la plus élevée du produit chimique d'essai entraînant une toxicité peut se définir comme la dose causant une réduction statistiquement significative de la proportion d'érythrocytes positifs au marqueur CD71 par rapport au total des érythrocytes, sans descendre en dessous de 5 % de la valeur témoin (29).

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

33. Pour obtenir des informations sur la relation dose-réponse, une étude complète doit comporter un groupe témoin négatif et au moins trois niveaux de doses, séparés en règle générale par un facteur de 2, et de 4 au maximum. Si le produit chimique d'essai ne provoque aucune toxicité dans le cadre d'une étude de détermination des doses à administrer, ou d'après les données disponibles, la dose la plus élevée par période d'administration de 14 jours ou plus doit être de 1 000 mg/kg de poids corporel/jour ou, pour des périodes d'administration de moins de 14 jours, de 2 000 mg/kg de poids corporel/jour. En revanche, si le produit chimique d'essai provoque une toxicité, la dose administrée la plus élevée devra correspondre à la DMT et les niveaux de dose employés devront de préférence s'étendre de la dose maximale à une dose induisant peu ou pas de toxicité. Lorsqu'une toxicité sur le tissu cible (moelle osseuse) est observée à tous les niveaux de doses administrés, il est conseillé de procéder à des études complémentaires à des doses non toxiques. Les études visant à caractériser davantage les informations sur la relation quantitative dose-réponse peuvent nécessiter un ou plusieurs groupes de traitement supplémentaires. Enfin, ces limites peuvent varier pour certains types de produits chimiques (par exemple les produits pharmaceutiques à usage humain) faisant l'objet d'exigences spécifiques.

Essai limite

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

35. Lors de la conception d'un essai, il convient de tenir compte de la voie d'exposition humaine anticipée. Par conséquent, les voies d'administration telles que l'alimentation, l'eau de boisson, l'inhalation, l'implantation ainsi que les voies topique, sous-cutanée, intraveineuse, orale (par gavage) et intra-trachéale sont autant de choix valables, sous réserve qu'ils soient justifiés. Dans tous les cas, la voie retenue doit permettre une exposition adéquate du/des tissu(s) cible(s). L'injection intrapéritonéale n'est en général pas recommandée, car elle ne constitue pas une voie d'exposition humaine envisagée, et ne sera utilisée qu'en cas de justification scientifique spécifique. Si le produit chimique d'essai est mélangé à l'alimentation ou à l'eau de boisson, surtout dans le cas d'un dosage unique, il convient de s'assurer que le délai entre l'absorption de nourriture et d'eau et le prélèvement est suffisant pour permettre une détection

des effets (voir paragraphe 37). Le volume maximal de liquide administrable en une fois par gavage ou par injection dépend de la taille de l'animal. Ce volume ne doit normalement pas excéder 1 ml/100 g de poids corporel, sauf pour les solutions aqueuses, où un maximum de 2 ml/100 g est acceptable. L'utilisation de volumes plus importants doit être justifiée. Il convient de réduire au minimum la variation du volume administré en ajustant la concentration à tous les niveaux de doses, afin de garantir l'administration d'un volume constant pour un poids corporel donné, sauf pour les produits irritants ou corrosifs dont les effets sont généralement exacerbés lorsqu'on augmente la concentration.

Programme de traitement

36. On réalisera de préférence deux traitements ou plus, administrés à des intervalles de 24 heures, notamment lorsque l'essai est intégré à d'autres études de toxicité. Alternativement, on pourra administrer des traitements simples, si cela s'avère scientifiquement justifié (par exemple dans le cas de produits chimiques d'essai connus pour bloquer le cycle cellulaire). L'administration du produit chimique d'essai peut aussi être fractionnée, à raison de deux traitements le même jour à intervalle de deux à trois heures maximum, afin de faciliter l'administration d'un grand volume. En pareil cas, ou lors d'une administration du produit chimique d'essai par inhalation, le moment d'échantillonnage sera fixé en fonction du moment d'administration de la dernière fraction, ou de la fin de l'exposition.

37. L'essai peut s'accomplir chez la souris ou le rat de trois manières différentes :

a. Le produit chimique d'essai est administré en une seule fois aux animaux. Des échantillons de moelle osseuse sont prélevés au moins deux fois (sur des groupes d'animaux indépendants), au plus tôt 24 heures et au plus tard 48 heures après le traitement, à intervalle(s) approprié(s), sauf s'il est avéré que la demi-vie de la substance d'essai est particulièrement longue. Les prélèvements effectués moins de 24 heures après le traitement doivent être justifiés. Les échantillons du sang périphérique sont prélevés au moins deux fois (sur le même groupe d'animaux), au plus tôt 36 heures et au plus tard 72 heures après le traitement, à intervalles appropriés. Au premier moment d'échantillonnage, tous les groupes de traitement doivent être traités et des échantillons collectés pour analyse ; cependant, lors du/des prélèvement(s) ultérieur(s), seule la dose la plus élevée doit être administrée. Dès qu'une réponse positive est obtenue, il est inutile de poursuivre les prélèvements, sauf si l'on a besoin d'obtenir des informations quantitatives sur la relation dose-réponse. Les intervalles de prélèvement découlent de la cinétique d'apparition et de disparition des micronoyaux dans ces deux compartiments tissulaires.

b. Lorsque deux traitements sont administrés (par exemple deux traitements à 24 heures d'intervalle), les échantillons doivent être prélevés une seule fois, entre 18 et 24 heures après le traitement final dans le cas de la moelle osseuse, et entre 36 et 48 heures dans celui du sang périphérique (30). Les intervalles de prélèvement découlent de la cinétique d'apparition et de disparition des micronoyaux dans ces deux compartiments tissulaires.

c. Si trois traitements, ou davantage, sont administrés (par exemple trois traitements ou plus à environ 24 heures d'intervalle), les échantillons de moelle osseuse doivent être prélevés au plus tard 24 heures après le traitement final, et ceux de sang périphérique au plus tard 40 heures après le dernier traitement (31). Ce régime de traitement permet de combiner le test des comètes (par exemple, prélèvement 2 à 6 heures après le dernier traitement) et le test du micronoyau, ainsi que d'intégrer le test du micronoyau à des études de toxicité par administration répétée. D'après les données disponibles, l'induction de micronoyaux peut s'observer sur ces délais allongés après trois administrations de traitement, ou davantage (15).

38. D'autres régimes de traitement ou de prélèvement peuvent être envisagés le cas échéant et sous réserve qu'ils soient scientifiquement justifiés, ainsi que pour faciliter l'intégration avec d'autres essais de toxicité.

Observations

39. Les animaux d'essai font l'objet d'un examen clinique général. Les signes cliniques doivent être consignés au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets anticipés devraient être les plus marqués après l'administration. Au moins deux fois par jour pendant la durée du traitement, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité. Tous les animaux doivent être pesés au début de l'étude, au moins une fois par semaine au cours des études à doses répétées, puis lors de l'euthanasie. Pour les études dont la durée est égale ou supérieure à une semaine, la consommation de nourriture doit également être mesurée au moins une fois par semaine. Si le produit chimique testé est administré dans l'eau de boisson, la consommation d'eau est mesurée à chaque changement d'eau et au moins une fois par semaine. Les animaux montrant des signes non létaux de toxicité excessive sont euthanasiés avant la fin de l'essai (28). Dans certaines circonstances, la température corporelle des animaux peut être surveillée, une hyper- ou une hypothermie causée par le traitement pouvant fausser les résultats (32) (33) (34).

Exposition du tissu cible

40. Lorsque cela se justifie et qu'il n'existe pas d'autres données sur l'exposition (voir paragraphe 48), il convient de réaliser un prélèvement sanguin au(x) moment(s) idoine(s) pour vérifier la concentration des substances chimiques d'essai dans le plasma afin de démontrer que la moelle osseuse a bien été exposée.

Préparation de la moelle osseuse et du sang

41. Les cellules de moelle osseuse sont généralement obtenues à partir des fémurs ou tibias des animaux, immédiatement après l'euthanasie. Le plus souvent, les cellules sont extraites, préparées et colorées suivant des méthodes bien établies. De faibles volumes de sang périphérique peuvent être prélevés, conformément aux normes en vigueur en matière de bien-être animal, soit selon une méthode permettant la survie de l'animal d'essai (par exemple prélèvement dans la veine caudale ou un autre vaisseau sanguin approprié), soit par ponction cardiaque ou prélèvement sur un vaisseau sanguin principal, après l'euthanasie de l'animal. Pour les érythrocytes provenant de la moelle osseuse ou du sang périphérique, suivant la méthode d'analyse, on peut effectuer immédiatement une coloration supravitale des cellules sanguines (16) (17) (18) ou des frottis qui sont ensuite colorés pour analyse microscopique, ou fixés puis colorés de manière idoine pour analyse par cytométrie en flux. L'emploi d'un colorant spécifique de l'ADN [par exemple, l'acridine orange (35) ou l'Hoechst 33258 avec la pyronine-Y (36)] peut éliminer une partie des artefacts associés à l'utilisation d'un colorant non spécifique de l'ADN. Cet avantage n'exclut pas l'utilisation de colorants classiques (par exemple le Giemsa pour l'analyse microscopique). D'autres méthodes, faisant par exemple appel à des colonnes de cellulose pour retirer les cellules nucléées (37) (38), peuvent être utilisées à condition que leur compatibilité avec la préparation d'échantillon dans le laboratoire ait été démontrée.

42. Lorsque ces méthodes sont applicables, les anticorps anti-kinétochore (39), la méthode FISH associée à des sondes ADN pancentromériques (40) ou encore le marquage *in situ* par amorçage à l'aide d'amorces pancentromériques, avec un colorant de contraste de l'ADN approprié (41), peuvent être utilisés pour identifier le contenu (chromosomes/fragments chromosomiques) des micronoyaux afin de

déterminer si le mécanisme d'induction des micronoyaux est le résultat d'une activité clastogène et/ou aneugène. D'autres méthodes de discrimination des effets clastogènes et aneugènes peuvent être utilisées, à condition que leur efficacité ait été prouvée.

Analyse (manuelle et automatique)

43. Toutes les lames et échantillons, y compris ceux des témoins positifs et négatifs, doivent être codés individuellement avant tout type d'analyse, et doivent être randomisés afin que l'analyste ne puisse pas connaître le traitement utilisé. Ce codage est inutile si l'on fait appel à un système d'analyse automatique, auquel cas l'analyse ne s'appuie pas sur un examen visuel et ne peut être affectée par un biais de l'opérateur. Pour chaque animal, on détermine la proportion d'érythrocytes immatures dans le nombre total d'érythrocytes (immatures + matures) en comptant au moins 500 érythrocytes dans le cas de la moelle osseuse et 2 000 érythrocytes dans le cas du sang périphérique (42). L'incidence des érythrocytes immatures micronucléés est déterminée sur la base de l'examen d'au moins 4 000 érythrocytes immatures par animal (43). Si la base de données des témoins négatifs historiques indique une fréquence de fond moyenne des érythrocytes immature micronucléés $< 0.1 \%$ dans le laboratoire, il convient d'envisager l'examen de cellules supplémentaires. À l'examen des lames, le pourcentage d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes chez les animaux traités ne doit pas être inférieur à 20 % de cette valeur pour les témoins de véhicule/solvant lors de l'analyse microscopique, et pas inférieur à environ 5 % de cette valeur pour les témoins de véhicule/solvant lors de l'analyse par cytométrie des érythrocytes immatures positifs au marqueur CD71 (voir paragraphe 31) (29). Par exemple, pour un essai sur moelle osseuse avec examen microscopique, si la proportion témoin d'érythrocytes immatures dans la moelle osseuse est de 50 %, la limite supérieure de toxicité équivaldra à 10 % d'érythrocytes immatures.

44. Étant donné que la rate de rat immobilise et détruit les érythrocytes micronucléés, pour maintenir la sensibilité de l'essai lors de l'analyse du sang périphérique chez le rat, il est préférable de circonscrire l'analyse aux érythrocytes immatures micronucléés les plus jeunes. En cas d'utilisation de méthodes d'analyse automatique, ces érythrocytes les plus immatures peuvent être repérés grâce à leur contenu élevé en ARN, ou au niveau élevé de récepteurs de la transferrine (positifs au marqueur CD71) exprimés à leur surface (31). Toutefois, une comparaison directe des différentes méthodes de coloration a révélé que plusieurs méthodes permettaient d'obtenir des résultats satisfaisants, y compris la méthode classique de coloration à l'acridine orange (3) (4).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des résultats

45. Les résultats individuels pour chaque animal doivent être présentés sous forme de tableaux. Le nombre d'érythrocytes immatures examinés, le nombre d'érythrocytes immatures micronucléés et la proportion d'érythrocytes immatures doivent être présentés séparément pour chaque animal analysé. Si des souris sont traitées en continu pendant au moins quatre semaines, il convient de fournir également les données relatives au nombre et à la proportion d'érythrocytes matures micronucléés, si elles ont été recueillies. Les données relatives à la toxicité pour l'animal et aux signes cliniques doivent elles-aussi être consignées.

Critères d'acceptabilité

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

- a) Les données relatives aux témoins négatifs concomitants sont considérées comme pouvant être ajoutées à la base de données des témoins historiques du laboratoire (voir paragraphes 15 à 18).
- b) Les témoins positifs ou témoins d'examen concomitants doivent induire des réponses compatibles avec celles générées par les témoins positifs et figurant dans la base de données historiques et produire une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin négatif concomitant (voir paragraphes 24 et 25).
- c) Le nombre idoine de doses et de cellules est analysé.
- d) Les critères de sélection de la dose la plus élevée sont cohérents avec ceux décrits aux paragraphes 30 à 33.

Évaluation et interprétation des résultats

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

- a) au moins un des groupes de traitement présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés par comparaison avec le témoin négatif concomitant,
- b) un test de tendance approprié montre que l'augmentation est liée à la dose pour au moins l'un des moments d'échantillonnage,
- c) des résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson).

Si seule la dose la plus élevée est examinée à un moment d'échantillonnage particulier, un produit chimique d'essai est considéré comme clairement positif si on constate une augmentation statistiquement significative par rapport aux témoins négatifs concomitants et que les résultats se situent à l'extérieur de la plage de distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson). Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (44) (45) (46) (47). Une analyse de la relation dose-réponse doit porter sur un minimum de trois groupes de traitement. Les méthodes statistiques doivent utiliser l'animal comme unité expérimentale. Des résultats positifs obtenus dans un test du micronoyau indiquent qu'un produit chimique d'essai induit la formation de micronoyaux, qui résultent de lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastés chez l'espèce utilisée dans l'essai. Si l'on cherche à détecter des centromères dans les micronoyaux, la mise en évidence de tels micronoyaux pourvus de centromères (par détection d'ADN centromérique ou de kinétochore, signes d'une perte chromosomique) révèle le caractère aneugène du produit chimique d'essai.

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

- a) aucun des groupes de traitement ne présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés par comparaison avec les témoins négatifs parallèles,
- b) un test de tendance approprié montre qu'à aucun des moments d'échantillonnage, il n'y a d'augmentation liée à la dose,
- c) l'intégralité des résultats se situe à l'intérieur de la distribution des données des témoins négatifs historiques (par exemple, limites de contrôle à 95 % d'une loi de Poisson), et
- d) il y a bien eu exposition de la moelle osseuse à la/aux substances chimiques d'essai.

Des recommandations concernant les méthodes statistiques les plus appropriées sont disponibles dans la littérature (44) (45) (46) (47). L'exposition de la moelle osseuse à une substance chimique d'essai peut être démontrée par une baisse du ratio entre érythrocytes immatures et matures, ou par la mesure de la concentration de la substance chimique dans le plasma ou le sang. Dans le cas d'une administration par intraveineuse, la preuve de l'exposition n'est pas nécessaire. Pour démontrer l'exposition de la moelle osseuse, on peut également avoir recours aux données ADME, obtenues dans le cadre d'une étude indépendante employant la même voie d'administration et la même espèce. Des résultats négatifs signifient que, dans les conditions de l'essai, le produit chimique d'essai n'induit pas de micronoyau dans les érythrocytes immatures chez l'espèce testée.

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

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

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

Rapport d'essai

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

Résumé

Produit chimique d'essai :

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

Substance mono-constituant :

- apparence physique, hydro-solubilité, autres propriétés physico-chimiques importantes pour la conduite de l'étude ;

- identification chimique : nom IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si les conditions pratiques le permettent, etc.

Substance multi-constituants, UVCB et mélanges :

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

Préparation du produit chimique d'essai :

- justification du choix du véhicule ;
- solubilité et stabilité du produit chimique 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 :

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

Conditions expérimentales :

- données relatives aux témoins positifs et négatifs (solvant/véhicule) ;
- données issues de l'étude de détermination des doses, si elle a été réalisée ;
- justification du choix des doses ;
- détails sur la préparation du produit chimique d'essai ;
- détails sur l'administration du produit chimique d'essai ;
- justification de la voie et de la durée d'administration ;
- méthodes utilisées pour vérifier que la/les substances chimiques d'essai a/ont atteint la circulation générale ou le tissu cible ;
- dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour) calculée en fonction de la concentration (ppm) du produit chimique d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson, et de la consommation, s'il y a lieu ;
- détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau ;
- méthode d'euthanasie ;
- méthode d'analgésie (le cas échéant) ;
- description détaillée des programmes de traitement et d'échantillonnage, et justification des choix ;
- méthodes de préparation des lames ;
- procédures d'isolement et de conservation des échantillons ;

- méthodes d'évaluation de la toxicité ;
- critères d'analyse des érythrocytes immatures micronucléés ;
- nombre de cellules analysées par animal pour déterminer la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés ainsi que la proportion d'érythrocytes immatures par rapport aux érythrocytes matures ;
- critères d'acceptabilité de l'étude ;
- méthodes utilisées pour déterminer si les micronoyaux contiennent des chromosomes entiers ou fragmentés (par exemple, recours aux anticorps anti-kinétochore ou à des sondes d'ADN centromériques), le cas échéant.

Résultats :

- état de santé des animaux avant et pendant la période d'essai, y compris signes de toxicité ;
- proportion d'érythrocytes immatures par rapport au nombre total d'érythrocytes ;
- nombre d'érythrocytes immatures micronucléés, donné séparément pour chaque animal ;
- moyenne $\pm$ écart-type des érythrocytes immatures micronucléés par groupe ;
- relation dose-réponse, si possible ;
- analyses et méthodes statistiques employées ;
- données relatives aux témoins négatifs et positifs de l'essai, y compris les plages, moyennes et écarts-types ;
- données relatives aux témoins négatifs et positifs historiques, avec plages, moyennes, écarts-types, limites de contrôle à 95 % pour la distribution, ainsi que période couverte et nombre de points de données ;
- données mettant en évidence une exposition de la moelle osseuse ;
- données de caractérisation indiquant si les micronoyaux possèdent des chromosomes entiers ou fragmentés, le cas échéant ;
- critères remplis pour une réponse positive ou négative.

*Discussion des résultats.**Conclusion.**Références.*

BIBLIOGRAPHIE

- (1) OECD (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. Publications Hygiène et sécurité de l'environnement, Série sur les essais et les évaluations No. 234, OCDE, Paris.
- (2) Hayashi, M. et al. (2007), In vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 10-30.
- (3) MacGregor, J.T. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, *Toxicology Sciences*, Vol. 94/1, pp. 92-107.
- (4) Dertinger, S.D. et al. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, *Toxicological Sciences*, Vol. 94/1, pp. 83-91.
- (5) Dertinger, S.D. et al. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage, *Mutagenesis*, Vol. 26/1, pp. 139-145.
- (6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, *Mutation Research*, Vol. 370/1, pp. 65-73.
- (7) Asano, N., Katsuma, Y., Tamura, H., Higashikuni, N. and Hayashi, M. (1998). An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitality stained peripheral blood cells. *Mutat Res*, 404, 149-154.
- (8) Styles, J.A. et al. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, *Cytometry*, Vol. 44/2, pp. 153-155.
- (9) Heddle, J.A. (1973), A rapid in vivo test for chromosomal damage, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 187-190.
- (10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 31/1, pp. 9-15.
- (11) Heddle, J.A. et al. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 123/1, pp. 61-118.
- (12) Mavournin, K.H. et al. (1990), The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol. 239/1, pp. 29-80.
- (13) MacGregor, J.T. et al. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, *Developments in Toxicology Environmental Science*, Vol. 11, pp. 555-558.

- (14) MacGregor, J.T. et al. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 189/2, pp. 103-112.
- (15) MacGregor, J.T. et al. (1990), The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 14/3, pp. 513-522.
- (16) Hayashi, M. et al. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 245/4, pp. 245-249.
- (17) CSGMT/JEMS.MMS – The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.
- (18) CSGMT/JEMS.MMS – The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), *Mutagenesis*, Vol. 10/3, pp. 153-159.
- (19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 23/4, pp. 239-273.
- (20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 453/1, pp. 45-50.
- (21) Hayes, J. et al. (2009), The rat bone marrow micronucleus test--study design and statistical power, *Mutagenesis*, Vol. 24/5, pp. 419-424.
- (22) Wakata, A. et al. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 32/1, pp. 84-100.
- (23) Ryan, T.P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.
- (24) Hayashi, M. et al. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 87-90.
- (25) Rothfuss, A. et al. (2011), Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-120.
- (26) Hayashi, M. et al. (1994), In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 293-304.

- (27) Fielder, R.J. et al. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in in vivo mutagenicity assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/5, pp. 313-319.
- (28) OECD (2000), "Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation", OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.
- (29) LeBaron, M.J. et al. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/3, pp. 222-228.
- (30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, Vol. 10/4, pp. 313-319.
- (31) Hayashi, M. et al. (2000), In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 234-252.
- (32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.
- (33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 413/1, pp. 7-14.
- (34) Spencer, P.J. et al. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, *Toxicological Sciences*, Vol. 97/1, pp. 120-127.
- (35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Research Letters*, Vol. 120/4, pp. 241-247.
- (36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, *Mutation Research*, Vol. 120/4, pp. 269-275.
- (37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 213/1, pp. 91-104.
- (38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, *Mutation Research*, Vol. 439/1, pp. 121-126.
- (39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced in vivo, *Mutagenesis*, Vol. 5/4, pp. 411-415.
- (40) Miller, B.M. et al. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, Vol. 6/4, pp. 297-302.

- (41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, *American Journal of Medical Genetics*, Vol. 107/2, pp. 99-104.
- (42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 347/2, pp. 97-99.
- (43) OECD (2014), “Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines”, OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.
- (44) Richold, M. et al. (1990), “*In Vivo* Cytogenetics Assays”, in *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.
- (45) Lovell, D.P. et al. (1989), “Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays”, in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.
- (46) Hayashi, M. et al. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.
- (47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of in vivo rodent micronucleus assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 469/2, pp. 233-241.

ANNEXE 1

DÉFINITIONS

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.

Érythroblaste : Stade précoce du développement d'un érythrocyte, précédant immédiatement la formation de l'érythrocyte immature, et lors duquel la cellule contient encore un noyau.

Kinétochore : Structure protéique se formant au niveau du centromère des cellules eucaryotes, qui relie le chromosome à des polymères microtubulaires provenant du fuseau mitotique au cours de la mitose et de la méiose, et qui agit pendant la division cellulaire pour séparer les chromatides sœurs.

Micronoyau : Petit noyau, présent en plus du noyau principal des cellules et séparé de celui-ci, produit pendant la télophase de la mitose (méiose) par des chromosomes ou des fragments de chromosomes retardataires.

Érythrocyte normochromatique ou mature : Érythrocyte parvenu à maturité complète ayant perdu l'ARN résiduel demeurant après l'énucléation et/ou ayant perdu d'autres marqueurs cellulaires à vie courte qui disparaissent généralement après l'énucléation qui suit la division finale de l'érythroblaste.

Érythrocyte polychromatique ou immature : Érythrocyte nouvellement formé, à un stade intermédiaire de son développement, réagissant aux composants bleus et rouges des colorants classiques du sang tels que la coloration Giemsa-Wright, en raison de la présence d'ARN résiduel. De telles cellules nouvellement formées sont pratiquement identiques aux réticulocytes, observables au moyen d'une coloration vitale sous l'action de laquelle l'ARN résiduel s'agglutine pour former un réticulum. D'autres méthodes, telles que la coloration monochromatique de l'ARN à l'aide de colorants fluorescents, ou le repérage des marqueurs de surface à vie courte tels que le CD71 au moyen d'anticorps fluorescents, sont aujourd'hui utilisées pour détecter les cellules sanguines nouvellement formées. Les érythrocytes polychromatiques, les réticulocytes et les érythrocytes positifs aux marqueurs CD71 sont tous des érythrocytes immatures, correspondant à différents stades d'évolution.

Réticulocyte : Érythrocyte nouvellement formé coloré au moyen d'un colorant vital sous l'action duquel l'ARN cellulaire résiduel s'agglutine pour former un réticulum caractéristique. Réticulocytes et érythrocytes polychromatiques sont des érythrocytes à un stade de développement très proche l'un de l'autre.

ANNEXE 2

PLAN FACTORIEL UTILISÉ POUR IDENTIFIER LES DIFFÉRENCES ENTRE SEXES DANS LE TEST DU MICRONOYAU *IN VIVO**Plan factoriel et analyse factorielle*

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

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

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

On examine ensuite le terme d'interaction sexe x concentration dans un tableau ANOVA¹. En l'absence de terme d'interaction significatif, la combinaison des valeurs inter-sexes ou inter-niveaux de concentration permet de réaliser des tests statistiques valides entre les niveaux, en se basant sur le terme de variabilité intra-groupe combinée fourni par l'ANOVA.

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

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

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

Références

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

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

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

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

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

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

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

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