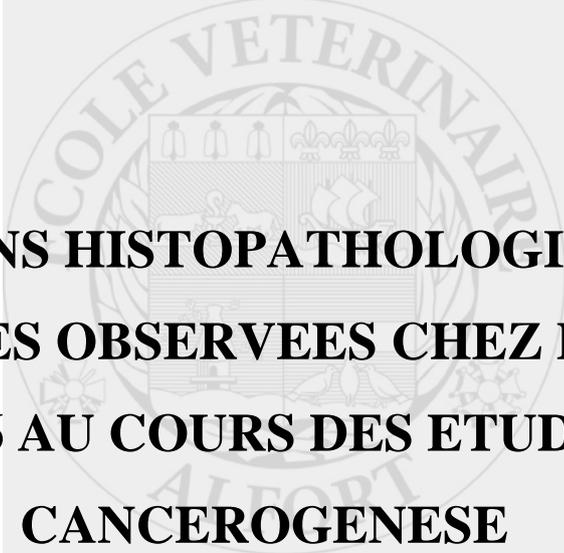


Année 2009



**LESIONS HISTOPATHOLOGIQUES
SPONTANÉES OBSERVÉES CHEZ LA SOURIS
C57BL/6 AU COURS DES ÉTUDES DE
CANCÉROGÈNESE**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MÉDECINE DE CRETEIL

le.....

par

Laëtitia ELIES

Née le 12 Février 1975 à Neuilly sur Marne (Seine-Saint-Denis)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Mme BERNEX Florence

Maître de conférences

Assesseur : M. TIRET Laurent

Maître de conférences

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur MIALOT Jean-Paul

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard

Professeurs honoraires: MM. BRUGERE Henri, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard, CRESPEAU François
LE BARS Henri, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques,

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : Mme COMBRISSE Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences

<p>- UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mme ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henry, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur M. FREYBURGER Ludovic, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE Mme COMBRISSE Hélène, Professeur* M. TIRET Laurent, Maître de conférences Mme STORCK-PILOT Fanny, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur M. TISSIER Renaud, Maître de conférences* M. PERROT Sébastien, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p>	<p>-UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur * Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences M. REYES GOMEZ Edouard, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences*</p> <p>- UNITE DE BIOCHIMIE M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences* M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : ANGLAIS Mme CONAN Muriel, Professeur certifié</p> <p>- DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE M. PHILIPS, Professeur certifié</p>
---	---

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur

<p>- UNITE DE MEDECINE M. POUCHELON Jean-Louis, Professeur* Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. BLOT Stéphane, Professeur M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences Mme MAUREY Christelle, Maître de conférences Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur M. AUDIGIE Fabrice, Professeur* Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier Mlle CHRISTMANN Undine, Maître de conférences Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Maître de conférences contractuel Mme PRADIER Sophie, Maître de conférences contractuel M. CARNICER David, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Professeur (rattachée au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences* M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences (rattachée au DPASP) Mme DEGUILLAUME Laure, Maître de conférences contractuel (rattachée au DPASP)</p> <p>- DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS Mme Françoise ROUX, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MOISSONNIER Pierre, Professeur M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences M. JARDEL Nicolas, Praticien hospitalier</p> <p>- UNITE D'IMAGERIE MEDICALE Mme BEGON Dominique, Professeur* Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier</p> <p>- DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur * M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Professeur Mme MARGNAC Geneviève, Maître de conférences Mme HALOS Lénaïg, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. HUBERT Blaise, Praticien hospitalier</p> <p>- UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT M. GRANDJEAN Dominique, Professeur * Mme YAGUIYAN-COLLARD Laurence, Maître de conférences contractuel</p> <p>- DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION M. PARAGON Bernard, Professeur</p>
---	---

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur

<p>- UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD/ HOANG-XUAN Nadia, Professeur Mme DUFOUR Barbara, Professeur Melle PRAUD Anne, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p> <p>- DISCIPLINE : BIostatISTIQUES M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences contractuel</p>	<p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. COURREAU Jean-François, Professeur M. BOSSE Philippe, Professeur Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Professeur*</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences * Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur (rattachée au DSBP) M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences M. ADJOU Karim, Maître de conférences M. BELBIS Guillaume, Maître de conférences contractuel</p>
---	---

* Responsable de l'Unité

REMERCIEMENTS

Au Professeur de la Faculté de Médecine de Créteil,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse.

Hommage respectueux.

A Madame le Docteur **Florence Bernex**,

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui a accepté de diriger ce travail et qui m'a apporté sa confiance, ses précieux conseils, et sa bonne humeur.

Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur **Laurent Tiret**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui a accepté de faire partie de ce jury.

Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur **Frédéric Schorsch**,

Qui m'a accueillie dans son équipe et m'a permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Profonde reconnaissance.

A Lou-Anne et Maïwenn,

Merci d'illuminer ainsi ma vie chaque jour.

A Gilles,

Merci pour ton soutien. Sans toi je n'y serais pas arrivée.

A mes parents,

Merci pour m'avoir permis de réaliser ces longues études et d'avoir toujours eu confiance en moi.

A ma sœur Lydia, à ma nièce Zoë,

Merci pour votre présence au quotidien malgré la distance.

A mon beau-père Alain,

A ma grand-mère Mireille,

Merci pour votre soutien.

A mes grands-parents Félicie, Léon et Raymond.

A Marie-Françoise,

Où que vous soyez...merci pour tout.

A Cécile et Pierre,

Merci pour votre amitié.

A mes collègues de travail,

Merci à ceux qui ont contribué de près ou de loin à ces études. Je pense tout particulièrement à Frédéric, Pierre, Marie-Claude, Alexandra.

A Anne-Laure Bauchet,

Merci pour les belles photos...

A Isidore, Olga...

LESIONS HISTOPATHOLOGIQUES SPONTANÉES OBSERVÉES CHEZ LA SOURIS C57BL/6 AU COURS DES ÉTUDES DE CANCÉROGÈNESE

NOM et Prénom : ELIES Laëtitia

Résumé

Les études de cancérogénèse sont parmi les études de toxicologie les plus importantes dans l'évaluation de l'innocuité d'un produit phytopharmaceutique. L'évaluation histopathologique constitue l'étape ultime et cruciale d'une étude de cancérogénèse. L'objectif de ce travail a été de présenter les lésions histopathologiques spontanées observées au cours de sept études de cancérogénèse réalisées chez la souris C57BL/6 au sein d'un centre de recherche privé. La souris C57BL/6 a présenté un taux de survie élevé après 18 mois. La dermatite ulcéreuse chronique, pathologie spécifique des souris au pelage noir, a représenté de loin la cause la plus fréquente d'euthanasie avant la fin de l'étude. L'amyloïdose systémique a été la lésion non tumorale la plus fréquemment observée. L'incidence globale des tumeurs a été assez faible comparée à celle rapportée dans d'autres souches. Les lésions tumorales ont été plus fréquemment observées chez les femelles que chez les mâles et elles étaient plus souvent bénignes que malignes. L'adénome hypophysaire, le lymphome malin multicentrique et l'adénome bronchiolo-alvéolaire du poumon ont été les trois tumeurs les plus fréquemment observées.

Mots clés

CANCÉROGÈNESE / TUMEUR / LÉSION / HISTOPATHOLOGIE / ADÉNOME HYPOPHYSAIRE / ADÉNOME BRONCHIOLO-ALVÉOLAIRE / LYMPHOME MALIN MULTICENTRIQUE / ÉTUDE EXPERIMENTALE / ANIMAUX AGES / RONGEUR / SOURIS / C57BL/6

Jury :

Président : Pr. _____, Faculté de Médecine de Créteil

Directeur : Dr BERNEX Florence, Maître de conférences à l'ENVA

Assesseur : Dr TIRET Laurent, Maître de conférences à l'ENVA

Adresse de l'auteur : 1, chemin des Colles, 06650 OPIO

SPONTANEOUS HISTOPATHOLOGICAL LESIONS OBSERVED IN THE C57BL/6 MOUSE IN CARCINOGENICITY STUDIES

SURNAME : ELIES

Given name : Laëtitia

Summary

Carcinogenicity studies are amongst the most important toxicological studies in the evaluation of drug safety. Histopathological evaluation is the latest and crucial step of the carcinogenicity study. Here are presented spontaneous histopathological lesions observed in C57BL/6 mice during seven carcinogenicity studies performed in a private laboratory. The survival rate of the C57BL/6 mouse was high after a 18-month period. Chronic ulcerative dermatitis, which is specific to black mice, was the most common cause of euthanasia before the end of the study. Systemic amyloidosis was the most common non neoplastic lesion observed. The global incidence of tumors was low when compared to other strains of mice. Female mice were more affected than males and the tumors were more frequently benign than malignant. Pituitary gland adenoma, systemic malignant lymphoma and bronchiolo-alveolar adenoma in the lung were the most common tumors.

Keywords

CARCINOGENICITY / TUMOR / LESION / HISTOPATHOLOGY / PITUITARY ADENOMA / BRONCHIOLO-ALVEOLAR ADENOMA / MALIGNANT LYMPHOMA / EXPERIMENTAL STUDY / AGING ANIMALS / RODENT / MOUSE / C57BL/6

Jury :

President : Pr. _____, Faculty of Medecine of Créteil

Director : Dr BERNEX Florence, Associate Professor at the Alfort School of Veterinary Medecine

Assessor : Dr TIRET Laurent, Associate Professor at the Alfort School of Veterinary Medecine

Author's Address:

1, chemin des Colles

06650 OPIO

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux.....	4
Liste des figures	6
Liste des annexes	8
Liste des abréviations.....	10
INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE : GENERALITES.....	13
I. Généralités sur la souche C57BL/6.....	15
A. Historique de la souche	15
B. Caractéristiques.....	17
C. Intérêt de l'utilisation en toxicologie	18
II. Généralités sur les études de toxicologie	19
A. Les différents types d'étude de toxicologie	19
B. But et déroulement d'une étude de cancérogène	21
1) Substance à tester	21
2) Animaux d'expérience	21
3) Conditions expérimentales.....	22
4) Voies d'administration.....	22
5) Durée de l'étude	23
6) Résultats et rapport.....	23
C. Intérêt des données historiques	25
1) Données historiques « internes »	25
2) Données historiques « externes ».....	26
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES.....	27
I. Les animaux et les conditions d'hébergement	29
II. Phase in vivo	30
III. Phase post-mortem.....	31
A. Autopsie, prélèvements et histotechnologie.....	31

B.	Histopathologie	33
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION		35
I.	Survie et causes de mortalité.....	37
A.	Analyse de la survie	37
1)	Résultats	37
2)	Discussion	39
B.	Causes de mortalité	40
1)	Résultats	40
2)	Discussion	44
II.	Lésions non tumorales	45
A.	Lésions systémiques.....	45
1)	Amyloïdose	45
2)	Artérite/périartérite.....	50
3)	Minéralisations dystrophiques	52
B.	Lésions de l'appareil digestif	54
1)	Foie.....	54
2)	Vésicule biliaire	58
3)	Tube digestif	61
C.	Lésions de l'appareil uro-génital.....	64
1)	Rein	64
2)	Appareil reproducteur mâle	68
3)	Appareil reproducteur femelle	72
D.	Lésions du système cardio-respiratoire.....	76
1)	Cœur.....	76
2)	Poumons.....	79
E.	Lésions des glandes endocrines	81
1)	Glandes surrénales	81
2)	Glandes thyroïdes et parathyroïdes	82
3)	Hypophyse	84
F.	Lésions du système hématolymphopoïétique	85
1)	Hématopoïèse extra-médullaire	86
2)	Lésions de la rate.....	88

3) Lésions du thymus	88
G. Lésions du système nerveux et de l'œil	92
1) Lésions du système nerveux	92
2) Lésions de l'œil, du nerf optique et de la glande de Harder	93
H. Peau, os, muscle	97
1) Dermatitis ulcéreuse chronique.....	97
2) Lésion fibro-osseuse	100
3) Dégénérescence articulaire et dégénérescence cartilagineuse	102
III. Lésions pré-tumorales et tumorales	103
A. Incidence globale des tumeurs	103
B. Relation entre lésion pré-tumorale et lésion tumorale	107
C. Lésions tumorales les plus fréquemment observées	108
1) Adénome hypophysaire.....	108
2) Lymphome malin	111
3) Adénome bronchiolo-alvéolaire du poumon.....	115
4) Fibrosarcome sous-cutané.....	117
5) Adénome folliculaire thyroïdien	119
6) Adénome de la glande de Harder	121
7) Adénome hépatocellulaire.....	123
CONCLUSION.....	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	127
ANNEXES	137

Liste des tableaux

Tableau 1: Liste des études de toxicologie pour l'évaluation des produits chimiques (liste non exhaustive)	20
Tableau 2 : Statut actuel de la base de données du RITA (Septembre 2008).....	26
Tableau 3: Liste des organes prélevés et examinés au microscope	32
Tableau 4 : Incidence de la mortalité et des causes de mort rencontrées au cours des 7 études de cancérogenèse.....	41
Tableau 5: Incidence de l'amyloïdose dans différents organes	45
Tableau 6: Incidence des lésions d'artérite/périartérite	50
Tableau 7: Incidence des lésions observées dans le foie	54
Tableau 8: Incidence des lésions observées dans la vésicule biliaire	58
Tableau 9: Incidence des lésions observées dans le tube digestif	61
Tableau 10: Incidence des lésions observées dans le rein	64
Tableau 11: Incidence des lésions observées dans l'appareil reproducteur mâle.....	68
Tableau 12: Incidence des lésions observées dans l'appareil reproducteur femelle	72
Tableau 13: Incidence des lésions observées dans le système cardio-respiratoire	76
Tableau 14 : Incidence des lésions observées dans les glandes endocrines	81
Tableau 15 : Incidence des lésions observées dans les organes hématolymphopoiétiques.....	86
Tableau 16: Lésions observées dans le système nerveux	92
Tableau 17 : Lésions observées dans l'œil, le nerf optique et la glande de Harder.....	93
Tableau 18 : Incidence des lésions observées dans la peau, l'os et le muscle.....	97
Tableau 19 : Critères de distinction entre hyperplasie et adénome de la pars distalis dans l'hypophyse (Mohr <i>et al.</i> , 2001)	108

Tableau 20 : Localisation des lymphomes malins observés au cours des études
de cancérogenèse..... 111

Tableau 21 : Différenciation entre hyperplasie lymphoïde et lymphome malin 113

Liste des figures

Figure 1 : Obtention de la souche consanguine C57BL/6J.....	15
Figure 2 : Phénotype de la souris C57BL/6.....	17
Figure 3 : Taux de survie moyen des animaux en fonction du temps.....	38
Figure 4 : Taux de survie des mâles au cours des 7 études de cancérogénèse [A-G] en fonction du temps	38
Figure 5 : Taux de survie des femelles au cours des 7 études de cancérogénèse [A-G] en fonction du temps	39
Figure 6 : Incidence des causes de mort non tumorales observées chez les mâles.....	42
Figure 7 : Incidence des causes de mort non tumorales observées chez les femelles	42
Figure 8 : Incidence des causes de mort tumorales observées chez les mâles.....	43
Figure 9 : Incidence des causes de mort tumorales observées chez les femelles	43
Figure 10 : Lésions d'amyloïdose (A à F)	47
Figure 11 : Lésion d'artérite sévère touchant une artère de petit calibre dans le tissu interstitiel à la périphérie de la colonne vertébrale	51
Figure 12 : Lésions de minéralisation dystrophiques (A à D)	53
Figure 13 : Lésions observées dans le foie (A à F).....	56
Figure 14 : Lésions observées dans la vésicule biliaire (A à D).....	60
Figure 15 : Lésions observées dans le tube digestif (A à D)	62
Figure 16 : Lésions observées dans le rein (A à D)	65
Figure 17 : Lésions observées dans l'appareil reproducteur mâle (A à F)	70
Figure 18 : Lésions observées dans l'appareil reproducteur femelle (A à F)	74
Figure 19 : Lésions observées dans le système cardio-respiratoire (A à F).....	78

Figure 20 : Lésions observées dans les glandes endocrines (A à F).....	83
Figure 21 : Lésions observées dans les organes hématolymphopoiétiques (A à F).....	87
Figure 22 : Lésions observées dans les organes hématolymphopoiétiques (suite) (A à E).....	90
Figure 23 : Lésions observées dans le système nerveux central et l'œil (A à F).....	95
Figure 24 : Dermatite ulcéreuse chronique (peau, HE, x4).	98
Figure 25 : Dermatite ulcéreuse chronique (peau, HE, x10)	98
Figure 26 : Lésion fibro-osseuse au sein d'une sternèbre (HE, x4).....	101
Figure 27 : Lésion fibro-osseuse au sein d'une sternèbre (HE, x20).....	101
Figure 28 : Adénome de la pars distalis (hypophyse, HE, x4)	109
Figure 29 : Adénome de la pars distalis (hypophyse, HE, x20)	109
Figure 30 : Lésions de lymphome malin observées dans la rate et le nœud lymphatique mésentérique	112
Figure 31 : Adénome bronchiolo-alvéolaire (poumon, HE, x4).....	115
Figure 32 : Fibrosarcome (tissu sous-cutané, HE, x20).....	117
Figure 33 : Adénome folliculaire kystique (glande thyroïde, HE, x4)	119
Figure 34 : Adénome de la glande de Harder (œil, HE, x2,5).....	121
Figure 35 : Adénome hépatocellulaire (foie, HE, x20).....	123

Liste des annexes

Annexe 1 : Taux de survie des mâles en fonction du temps au cours des 7 études de cancérogénèse.....	139
Annexe 2 : Taux de survie des femelles en fonction du temps au cours des 7 études de cancérogénèse.....	140
Annexe 3 : Données individuelles concernant la mortalité des mâles au cours des 7 études de cancérogénèse.....	141
Annexe 4 : Données individuelles concernant la mortalité des femelles au cours des 7 études de cancérogénèse.....	144
Annexe 5 : Incidence des causes de mort non tumorales (% par rapport au nombre total de morts).....	146
Annexe 6 : Incidence des causes de mort tumorales (% par rapport au nombre total de morts).....	147
Annexe 7 : Récapitulatif des souris mâles ayant une ou plusieurs tumeurs, bénignes ou malignes.....	148
Annexe 8 : Récapitulatif des souris femelles ayant une ou plusieurs tumeurs, bénignes ou malignes.....	149
Annexe 9 : Incidence des lésions tumorales observées chez la souris C57BL/6 au cours des 7 études de cancérogénèse.....	150
Annexe 10 : Incidence des tumeurs observées chez la souris B6C3F1 au cours de 27 études de cancérogénèse de la NTP (Haseman <i>et al.</i> , 1999).....	152
Annexe 11 : Incidence des tumeurs observées chez la souris CD-1 au cours de 59 études de cancérogénèse (Giknis et Clifford, 2005).....	154

Annexe 12 : Incidence des lésions pré-tumorales observées chez la souris C57BL/6 au cours

des 7 études de cancérogénèse.....156

Liste des abréviations

ACTH	<i>Adenocorticotropic Hormone</i>
Gène Cdh23	<i>Gène Cadherin 23</i>
DL50	Dose létale 50
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FSH	<i>Follicle-Stimulating hormone</i>
GH	<i>Growth Hormone</i>
HE	Héματοxyline et Eosine
IARC	<i>International classification of Rodent Tumors</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
NTP	<i>National Toxicology Program</i>
OCDE	Organisation de la Coopération et du Développement Economiques
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PTAH	<i>Phosphotungstic Acid-Hematoxylin</i>
RITA	<i>Registry of Industrial Toxicology Animal data</i>
SAM	<i>Senescence-Accelerated Mouse</i>
SPF	<i>Specific Pathogen-Free</i>
TSH	<i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>

INTRODUCTION

La commercialisation d'un produit phytopharmaceutique nécessite une autorisation de mise sur le marché, délivrée par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, sur la base d'une évaluation complète. Le demandeur de cette autorisation doit prouver l'innocuité de la préparation pour l'Homme (utilisateur et consommateur) et l'environnement (milieu, faune et flore). Le dossier doit comporter une évaluation des caractéristiques intrinsèques du produit, son profil toxicologique, les résidus dans les produits traités, ainsi que son profil écotoxicologique.

Parmi les nombreuses études permettant l'évaluation du profil toxicologique d'une nouvelle molécule, les études de cancérogenèse sont les plus lourdes à réaliser et les plus importantes. En effet, elles nécessitent un grand nombre d'animaux et au minimum trois années de travail (18 à 24 mois d'expérimentation et un an pour la rédaction du rapport). Elles sont les plus importantes car leurs résultats sont en général connus juste avant la soumission du dossier aux autorités et peuvent remettre en cause la commercialisation du produit si un pouvoir cancérigène est démontré ou même suspecté.

L'évaluation histopathologique constitue l'étape ultime et cruciale d'une étude de cancérogenèse. La comparaison entre les groupes contrôles et les groupes traités permet l'interprétation des résultats. La fiabilité de ces résultats repose à la fois sur l'utilisation d'un modèle animal connu, sur des conditions expérimentales standardisées et sur la compétence du pathologiste en charge de l'évaluation.

L'objectif de ce travail est de présenter les lésions histopathologiques spontanées observées au cours de sept études de cancérogenèse réalisées chez la souris C57BL/6 au sein d'un centre de recherche privé. La première partie de ce travail présentera les caractéristiques de la souche C57BL/6 ainsi qu'une synthèse sur les études de toxicologie en général et sur les études de cancérogenèse en particulier, en insistant sur l'importance des données historiques dans l'interprétation des résultats. Après avoir exposé les conditions expérimentales en seconde partie, la dernière partie sera consacrée à l'étude de la survie et des causes de mortalité, puis à la description histologique précise des lésions non tumorales et tumorales observées au cours de ces études ainsi qu'à leur incidence.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

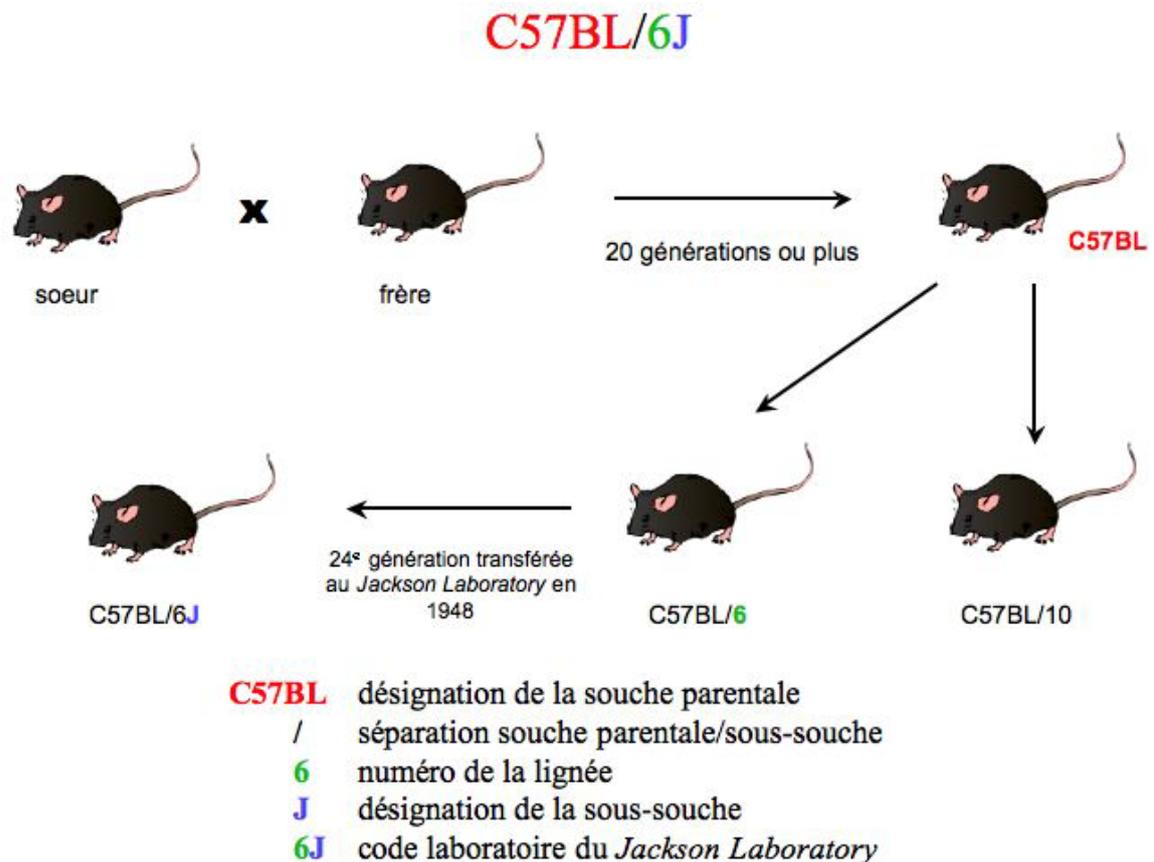
I. GENERALITES SUR LA SOUCHE C57BL/6

A. Historique de la souche

La souche C57BL a été créée en 1921 par le Docteur Clarence Cook Little, fondateur du *Jackson Laboratory*, à partir d'un croisement du stock de Miss Abby Lathrop (*The Jackson Laboratory*, 2008). En 1937, la colonie C57BL a été subdivisée en deux sous-lignées pour donner naissance aux souches C57BL/6 et C57BL/10 (**Figure 1**).

Figure 1 : Obtention de la souche consanguine C57BL/6J

(d'après *The Jackson Laboratory*, 2008)



La souche C57BL/6 est aujourd'hui la souche la plus répandue et la plus utilisée dans le domaine de la recherche (biologie du développement, biologie cardiovasculaire, diabète et obésité, immunologie, neurobiologie...) et de la toxicologie. L'ADN de la souche C57BL/6 a été utilisé

pour le premier séquençage du génome murin (Waterston *et al.*, 2002). Cette souche est également souvent utilisée pour la production de souris transgéniques.

Afin de faciliter l'approvisionnement de la souche dans le monde entier, les laboratoires Charles River ont été autorisés à élever et produire la souris C57BL/6 dans leurs animaleries au Japon et en Europe, sous le contrôle du *Jackson Laboratory*.

B. Caractéristiques

La souche C57BL/6 est caractérisée par un pelage noir intense (**Figure 2**), une durée de vie relativement longue (taux de survie de 50% après 30 mois) et une bonne capacité de reproduction.

Figure 2 : Phénotype de la souris C57BL/6



L'incidence des tumeurs est faible, notamment les tumeurs hépatiques et les tumeurs mammaires (incidence < 10%). Par contre l'incidence des lymphomes peut aller jusqu'à 70%.

Les autres caractéristiques de cette souche sont :

- une forte susceptibilité à l'obésité, au diabète de type 2 et à l'athérosclérose,
- une forte incidence de microphthalmie et autres anomalies congénitales oculaires,
- une faible densité osseuse,
- une prédisposition à l'hydrocéphalie héréditaire,
- une prédisposition à l'alopecie associée à un toilettage excessif (« *overgrooming* »),
- une surdité progressive et sévère en fin de vie (homozygotie pour la mutation *Cdh23^{ahl}*),
- une incidence augmentée de malocclusion dentaire.

C. Intérêt de l'utilisation en toxicologie

Parmi les souches de souris utilisées dans le domaine biomédical, on trouve des souches non consanguines, comme la CD-1, et des souches consanguines (C3H/He, CBA/Ca, BALB/c et C57BL/6). L'un des intérêts majeurs à utiliser une souche consanguine réside dans la stabilité génétique et l'uniformité phénotypique. En effet, une souche consanguine est obtenue après accouplement entre frères et sœurs pendant au moins 20 générations consécutives. Excepté la différence de sexe, les souris d'une même souche consanguine sont génétiquement aussi semblables que possible, et homozygotes pour virtuellement tous les allèles. Ces souches sont donc relativement stables et permettent de collecter des données historiques fiables au fil des années. Les données historiques sont très importantes en toxicologie, car elles permettent de distinguer les lésions spontanées des effets dus à la substance à tester. Chaque laboratoire choisit sa souche consanguine. Ici, le choix de la souche C57BL/6 s'explique par sa grande longévité et sa faible incidence globale de tumeurs.

II. GENERALITES SUR LES ETUDES DE TOXICOLOGIE

A. Les différents types d'étude de toxicologie

Le dossier de toxicologie à soumettre aux autorités réglementaires afin d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché d'un produit chimique doit comporter les résultats des différentes études réalisées *in vitro* et sur animaux de laboratoire. Les études de toxicologie dites réglementaires doivent suivre les lignes directrices de l'OCDE pour le marché Européen et celles de l'EPA pour le marché outre-Atlantique.

Les principales études de toxicologie réglementaires réalisées pour l'évaluation des risques des produits chimiques sont les suivantes (**Tableau 1**):

- études de toxicité aiguë : une seule administration ; différentes voies d'administration doivent être testées (orale, cutanée, oculaire, par inhalation). Pour la toxicité aiguë orale, la ligne directrice 401 du 17/12/2002 qui prévoyait des tests pour déterminer la DL50 a été annulée et remplacée par les lignes directrices 420, 423 et 425 qui privilégient des méthodes alternatives. Ceci a constitué un grand progrès pour la protection animale en diminuant le nombre d'animaux utilisés.
- études de toxicité subchronique : administration quotidienne du produit pendant 28 jours et 90 jours,
- études de toxicité chronique : administration quotidienne du produit pendant 12 mois et pendant 2 ans pour les études de cancérogenèse,
- études de neurotoxicité : toxicité aiguë, subchronique et neurotoxicité du développement,
- études de toxicité génétique : réalisées pour la plupart *in vitro* (bactéries, levures, cultures cellulaires) ou chez la drosophile.

Tableau 1: Liste des études de toxicologie pour l'évaluation des produits chimiques (liste non exhaustive)

Etude de toxicité	Espèce	Durée d'administration	Ligne directrice de l'OCDE	Ligne directrice de l'EPA
Toxicité orale aiguë	Rat	Unique	420 (17/12/01) 423 (17/12/01) 425 (21/09/98)	870.1100
Toxicité cutanée aiguë	Rat lapin cobaye	Unique	402 (24/02/87)	870.1200
Toxicité aiguë par inhalation	Rat	Unique	403 (12/05/81)	870.1300
Effet irritant/corrosif aigu pour les yeux	Lapin	Unique	405 (24/04/02)	870.2400
Effet irritant/corrosif aigu pour la peau	Lapin	Unique	404 (24/04/02)	870.2500
Sensibilisation de la peau	Cobaye	Unique	406 (17/07/92)	870.2600
Toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs	Rat souris	28 jours	407 (27/07/95)	870.3050
Toxicité orale à doses répétées chez les rongeurs pendant 90 jours	Rat, souris	90 jours	408 (21/09/98)	870.3100
Toxicité orale à doses répétées chez les non rongeurs pendant 90 jours	Chien	90 jours	409 (21/09/98)	870.3150
Toxicité pour la reproduction et le développement	Rat	54 jours	421 (27/07/95)	870.3200
Toxicité pour la reproduction sur une génération	Rat	-	415 (26/05/83)	870.3800
Toxicité pour la reproduction sur deux générations	Rat	-	416 (22/01/01)	870.3800
Toxicité pour le développement prénatal	Rat lapin	Durée de la gestation	414 (22/01/01)	870.3700
Neurotoxicité	Rat	Variable	424 (21/07/97)	870.6200
Toxicité chronique	Chien rat	12 mois	452 (12/05/81)	870.4100
Cancérogenèse	Rat souris	18 à 24 mois	451 (12/05/81)	870.4200
Toxicité chronique et cancérogenèse	Rat Souris	18 à 24 mois	453 (12/05/81)	870.4300

B. But et déroulement d'une étude de cancérogenèse

Une étude de cancérogenèse a pour objectif d'observer les animaux d'expérience pendant la majeure partie de leur durée de vie pour suivre le développement éventuel de lésions néoplasiques après ou durant l'exposition à différentes doses d'une substance à tester administrée par une voie appropriée.

Les recommandations de l'OCDE concernant les études de cancérogenèse chez l'animal de laboratoire sont résumées dans les paragraphes ci-après (OCDE, 1981).

1) Substance à tester

Les propriétés physico-chimiques de la substance doivent être connues. Une méthode analytique permettant la détermination qualitative et quantitative de la substance doit être mise au point avant le démarrage de l'étude.

2) Animaux d'expérience

◆ Choix de l'espèce

Il est recommandé de tester la substance sur deux espèces animales. Les rats et les souris ont presque toujours été préférés aux autres espèces, à cause de leur durée de vie relativement courte, du coût limité de leur entretien, de leur utilisation très large dans les études de pharmacologie et de toxicologie, de leur susceptibilité à l'induction de tumeurs et de la disponibilité de souches consanguines ou suffisamment caractérisées. Par conséquent, on dispose d'une grande quantité d'informations sur leur physiologie et leur pathologie spontanée.

◆ Sexe et âge des animaux

Il est recommandé d'utiliser des animaux des deux sexes. Les animaux sont sevrés au début de l'expérimentation et à peine matures sexuellement (6 semaines environ). Ceci permet de faire coïncider la plus importante partie de la durée de vie de l'animal pour le développement des tumeurs avec l'exposition à la substance à tester.

◆ Nombre d'animaux

Il faut utiliser un nombre suffisant d'animaux pour qu'à la fin de l'étude, chaque groupe contienne assez de sujets pour permettre une évaluation statistique et biologique complète. C'est

pourquoi, chacun des groupes correspondant à une dose et le groupe témoin parallèle doivent contenir au moins 50 animaux de chaque sexe.

3) **Conditions expérimentales**

◆ Doses et fréquences d'exposition

Afin d'évaluer la toxicité d'une substance, il faut utiliser au moins trois doses en plus du groupe contrôle. La dose supérieure doit être suffisamment élevée pour susciter des manifestations de toxicité minimale, sans altération notable de la durée de vie normale due à des effets autres que les tumeurs. La dose la plus faible ne doit pas influencer sur la croissance, le développement et la longévité de l'animal. Par ailleurs, elle ne doit pas être à l'origine de signes de toxicité. En général, elle doit atteindre au moins 10% de la dose la plus forte. La dose intermédiaire sera fixée à peu près à mi-chemin entre les deux autres doses, en tenant compte des propriétés toxicocinétiques dans la mesure où elles sont connues. Le choix des valeurs de dose doit être fait en fonction des données existantes, de préférence à partir de celles concernant une étude subchronique (90 jours).

La fréquence d'exposition est habituellement journalière, mais elle peut varier en fonction de la voie choisie. Si la substance à tester est administrée dans l'eau de boisson ou mélangée à la ration alimentaire, elle doit être présente à tout moment. La fréquence d'administration peut être ajustée en fonction du profil toxicocinétique de cette substance.

◆ Contrôles

Il faut réaliser en parallèle un groupe témoin qui soit en tout point identique aux groupes d'essai, sauf en ce qui concerne l'exposition à la substance à tester. Le groupe témoin négatif est traité de la même manière que tous les autres animaux d'essai, sauf qu'il ne doit pas être exposé à la substance à tester ou à tout véhicule de cette dernière. Si la substance à tester est administrée avec un véhicule, un groupe témoin supplémentaire ne recevant que le véhicule doit être présent.

4) **Voies d'administration**

Les trois principales voies d'administration sont l'ingestion orale, la pénétration cutanée et l'inhalation. Le choix de la voie d'administration dépend des propriétés physiques et chimiques de la substance à tester et de la forme typique d'exposition chez l'homme.

La voie orale aura la préférence, à condition que l'on puisse démontrer que la substance à tester est absorbée par le tractus gastro-intestinal. Les animaux recevront la substance à tester dans leur ration alimentaire, dissoute dans l'eau de boisson, ou administrée par gavage et ce, durant toute la durée de

l'étude. Dans le cas de l'administration dans la ration alimentaire, la plus haute concentration testée ne doit pas dépasser 5% de la ration totale, sauf si la substance à tester est une substance nutritive.

5) **Durée de l'étude**

Il est nécessaire que la durée d'une épreuve de cancérogenèse englobe la majeure partie de la durée de vie normale des animaux à utiliser. D'une façon générale, l'étude doit être poursuivie jusqu'à 18 mois pour les souris et les hamsters et jusqu'à 24 mois pour les rats. Toutefois, il est acceptable de terminer une étude dès que le nombre de survivants des groupes correspondant à la dose la plus faible ou des groupes témoins tombe à 25%.

Pour qu'un essai négatif soit acceptable, il doit répondre aux critères suivants :

- pas plus de 10% de perte dans chaque groupe pour des causes telles que le cannibalisme, l'autolyse ou les problèmes de gestion d'étude,
- au moins 50% de survivants dans tous les groupes au terme d'une période de 18 mois pour les souris et les hamsters et de 24 mois pour les rats.

6) **Résultats et rapport**

◆ Observations

Un examen clinique soigneux doit être pratiqué au moins une fois par jour. Une attention particulière est attribuée au développement des tumeurs : la date d'apparition, la localisation, les dimensions, l'apparence et l'évolution de toute tumeur visible à l'œil nu ou palpable doivent être enregistrées avec précision. Chaque animal doit être pesé au moins une fois par semaine durant les 13 premières semaines de la période d'essai et au moins toutes les quatre semaines par la suite.

◆ Anatomo-pathologie

L'examen anatomo-pathologique, tant macroscopique que microscopique, est souvent la pierre angulaire de l'étude de cancérogenèse. Une attention particulière est nécessaire aux observations qui doivent être décrites et rapportées en détail, y compris le diagnostic.

Une autopsie complète de tous les animaux, y compris ceux qui sont morts durant l'expérimentation ou qui ont été euthanasiés dans un état moribond, doit être réalisée. Avant le sacrifice de l'ensemble des animaux, des échantillons de sang doivent être prélevés sur tous les animaux en vue des formules sanguines. Toutes les tumeurs ou les lésions suspectées d'être des tumeurs, qui sont visibles à l'œil nu, doivent être conservées et fixées. On doit s'efforcer d'établir une corrélation entre les observations macroscopiques et les résultats microscopiques.

Tous les organes et tissus de tous les animaux doivent être fixés en vue de l'examen microscopique. Néanmoins, l'examen microscopique doit être réalisé au moins sur les éléments suivants :

- toutes les tumeurs ou lésions suspectées d'être des tumeurs, qui ont été découvertes à l'œil nu dans tous les groupes,
- tous les organes ou tissus fixés de tous les animaux morts ou euthanasiés au cours de l'étude,
- tous les organes ou tissus fixés des animaux du groupe correspondant à la dose la plus forte, ainsi que les témoins,
- si une différence importante est constatée dans les lésions hyperplasiques, pré-néoplasiques ou néoplasiques entre le groupe correspondant à la dose la plus élevée et le groupe témoin, il faut effectuer l'examen microscopique du tissu ou de l'organe concerné pour tous les animaux de l'étude.

◆ Rapport

Le rapport d'essai doit comprendre toutes les informations nécessaires pour fournir une description complète et précise des procédures d'essai, ainsi qu'une évaluation des résultats. Il doit contenir un résumé des résultats, une analyse de ces derniers et un exposé des conclusions tirées de l'analyse. Le résumé doit mettre en lumière les résultats ou les observations et tous les écarts par rapport aux témoins qui peuvent être indicatifs d'effets toxiques, en particulier les lésions hyperplasiques, pré-néoplasiques ou néoplasiques.

C. Intérêt des données historiques

Les études de cancérogenèse sont conduites afin d'évaluer le pouvoir cancérigène d'une substance en comparant les incidences des lésions tumorales et pré-tumorales observées chez les animaux traités par rapport aux animaux contrôles. Le groupe contrôle appartenant à l'étude est considéré comme le témoin le plus fiable puisque les animaux d'une même étude ont connu exactement les mêmes conditions. Cependant, dans les cas d'incidences atypiques de lésions tumorales ou pré-tumorales, la seule comparaison avec le groupe contrôle contemporain peut s'avérer insuffisante. L'incidence plus faible d'une tumeur dans le groupe contrôle peut conduire à une augmentation statistiquement significative de l'incidence dans les groupes traités. Inversement, l'incidence plus forte d'une tumeur dans le groupe contrôle peut masquer un risque cancérigène potentiel dans les groupes traités. Dans de tels cas de figure, l'utilisation des données historiques peut aider à évaluer le risque cancérigène d'une molécule (Haseman *et al.*, 1997).

La principale difficulté dans l'utilisation des données historiques est la comparabilité de l'étude concernée avec des études anciennes dont les facteurs suivants peuvent être différents :

- conditions environnementales,
- nourriture,
- poids corporel, âge et sexe des animaux,
- procédures d'autopsie,
- technique de préparation des lames,
- critères de diagnostic histopathologiques.

Deux solutions principales sont utilisées par les laboratoires de toxicologie en matière de données historiques : utilisation de données « internes » ou « externes ».

1) Données historiques « internes »

Ce sont les données les plus fiables après celles du groupe contrôle contemporain de l'étude. En effet, dans ce cas de figure, les études ont été faites dans les mêmes conditions : un seul laboratoire, le même fournisseur d'animaux, un régime alimentaire identique, les mêmes conditions d'hébergement, des critères de diagnostic à priori homogènes (une seule et même équipe de pathologistes). Bien sûr, cela signifie une longue expérience dans le laboratoire, et parfois le recul n'est pas assez important et les données internes sont insuffisantes : études de cancérogenèse sous-

traitées à l'extérieur, changement de souche de rat ou de souris ou même changement de nourriture ; dans ce cas, il faut recommencer à zéro les données historiques.

2) Données historiques « externes »

Dans le cas de données internes inexistantes ou insuffisantes, le pathologiste peut faire appel à des bases de données extérieures pour interpréter ses résultats. C'est le cas par exemple de la base de données du RITA (*Registry of Industrial Toxicology Animal data*) (Morawietz *et al.*, 1992). Le statut actuel de la base de données du RITA est présenté dans le **tableau 2**.

Créée en 1988 à Hannover par le *Fraunhofer Institute of Toxicology* et 13 compagnies pharmaceutiques et chimiques, cette base de données a pour objectif de centraliser des données historiques européennes standardisées pour l'évaluation du risque cancérigène. Chaque compagnie souhaitant y participer soumet les lésions tumorales et pré-tumorales des groupes contrôles des études de cancérogenèse. Pour chaque étude soumise, le laboratoire fournit toutes les informations nécessaires : souche de rat ou de souris, fournisseur commercial, sexe et âge des animaux, durée de l'étude, type et fournisseur de nourriture, conditions environnementales et poids corporels. Un panel de pathologistes revoit les lames et décide ou non d'inclure la lésion dans la base de données, en fonction de critères de diagnostic standardisés et publiés par le IARC (*International Classification of Rodent Tumors*).

Tableau 2 : Statut actuel de la base de données du RITA (Septembre 2008)

	<i>Rats</i>	<i>Souris</i>
Nombre d'études	146	62
Nombre d'animaux	14 938	5 883
Nombre de tumeurs primitives	22 288	5 126
Nombre de lésions pré-tumorales	24 838	2 771
Nombre total de cas (incluant les métastases)	55 872	19 685

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

I. LES ANIMAUX ET LES CONDITIONS D'HEBERGEMENT

Trois cent cinquante souris C57BL/6J (Laboratoires Charles River, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France) par sexe, issues de 7 études de cancérogenèse (groupes de 50 animaux) ont reçu une nourriture non traitée (animaux témoins) *ad libidum* pendant une durée équivalente à 78 semaines, soit un total de 700 animaux.

Une puce électronique a été implantée dans le tissu sous-cutané dorsal de chaque animal, afin de permettre une identification précise tout au long de l'étude.

Pour chaque étude, l'ensemble des animaux a été hébergé dans une seule pièce d'animalerie, avec un contrôle d'accès du personnel. Chaque animal a été hébergé dans une cage individuelle en acier inoxydable, suspendue sur un portoir, et identifiée avec le numéro de l'animal.

La température de l'air a été contrôlée pour être comprise entre 20°C et 24 °C, l'humidité relative entre 40 % et 70 % avec un cycle de 15 renouvellements d'air par heure.

Des cycles lumière-obscurité de 12 heures ont été réalisés automatiquement (7 heures à 19 heures).

II. PHASE IN VIVO

Pendant toute la durée des études, la mortalité et les signes cliniques ont été contrôlés deux fois par jour, sauf les week-end et les périodes de congés (une fois). Un examen clinique approfondi avec palpation des masses éventuelles a été réalisé chaque semaine.

Le poids corporel et la consommation de nourriture ont été mesurés chaque semaine les treize premières semaines (pour comparer avec les résultats de l'étude 90 jours) puis une fois par mois.

Un examen ophtalmologique a été réalisé sur tous les animaux pendant la phase de pré-étude (c'est-à-dire la phase d'acclimatation), puis sur 14 animaux par sexe et par groupe après 3, 6, 9 et 12 mois de traitement.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés à 12 et 18 mois de traitement sur les 20 premiers animaux survivants de chaque groupe, afin de mesurer des paramètres hématologiques.

III. PHASE POST-MORTEM

A. Autopsie, prélèvements et histotechnologie

Tout animal trouvé mort au cours de l'étude a été autopsié dans les 24 heures suivant la découverte. Les animaux euthanasiés pour raison éthique ou arrivés en fin d'étude ont été anesthésiés (injection de pentobarbital sodique ou inhalation d'Isoflurane®, selon l'étude), puis euthanasiés par exsanguination. Les animaux du sacrifice final, mis à jeun la veille, ont été pesés (poids corporel terminal).

Une autopsie complète a été pratiquée pour chaque animal, comportant un examen de l'apparence externe, des orifices, des cavités splanchniques, organes et tissus.

La puce électronique d'identification a été retrouvée et prélevée pour tous les animaux.

Les organes suivants, pour les animaux du sacrifice final uniquement, ont été pesés: cerveau, foie, rein, rate, cœur, glande surrénale, testicule, épидидyme, ovaire et utérus. Les organes pairs ont été pesés ensemble.

Les organes listés dans le **Tableau 3** ont été prélevés puis fixés dans du formol tamponné à 10%, à l'exception des yeux, nerfs optiques, glandes de Harder, testicules et épидидymes qui ont été fixés dans une solution de Davidson.

A l'exception des glandes lacrymales exorbitales, du larynx, du pharynx et des cavités nasales, tous les prélèvements ont été déshydratés, inclus en paraffine et des lames histologiques ont été préparées puis colorées à l'hématoxiline et éosine.

Tableau 3: Liste des organes prélevés et examinés au microscope

<p>SYSTEME ENDOCRINE</p> <p>Glandes surrénales Glandes thyroïdes et parathyroïdes hypophyse</p>	<p>SYSTEME NERVEUX</p> <p>Cerveau, cervelet Moelle épinière cervicale, thoracique et lombaire Nerf optique</p>
<p>SYSTEME CARDIO-VASCULAIRE ET RESPIRATOIRE</p> <p>Aorte Cœur Cavités nasales* Larynx/pharynx* Trachée Poumon</p>	<p>ORGANES DE LA REPRODUCTION</p> <p>Epididyme Testicule Prostate Vésicule séminale Ovaire Utérus (incluant le col) Vagin Glande mammaire</p>
<p>SYSTEME DIGESTIF</p> <p>Glande salivaire sous-maxillaire Langue Tube digestif (œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon, caecum, colon, rectum) Foie et vésicule biliaire Pancréas</p>	<p>APPAREIL LOCOMOTEUR</p> <p>Articulation fémoro-tibiale Muscle strié squelettique Nerf sciatique</p>
<p>SYSTEME LYMPHOÏDE ET HEMATOPOÏËTIQUE</p> <p>Moelle osseuse (sternum) Nœuds lymphatiques (mésentérique et sous- maxillaire) Rate Thymus</p>	<p>PEAU ET ORGANES DES SENS</p> <p>Peau Œil Glande lacrymale exorbitale* Glande de Harder</p>
<p>SYSTEME URINAIRE</p> <p>Rein Vessie</p>	<p>PRELEVEMENTS SUPPLEMENTAIRES</p> <p>Lésions macroscopiques Masses (avec si possible le nœud lymphatique loco-régional associé)</p>

* organes non examinés au microscope

B. Histopathologie

Toutes les données collectées pendant les phases *in vivo* et *post-mortem* (signes cliniques, poids corporel, consommation de nourriture, hématologie, poids d'organe, lésions macroscopiques et histopathologiques) ont été saisies directement dans un système informatique (logiciel Path/Tox System® version 4.2.2, Xybion).

Pour chaque étude, l'ensemble des lectures histopathologiques a été effectué par un seul et même pathologiste, vétérinaire ou médecin de formation. Les 7 études ont été lues par 3 pathologistes différents. La lecture des lames a été réalisée animal par animal. Pour chaque animal, le pathologiste a observé tous les organes prévus au protocole ainsi que les prélèvements supplémentaires le cas échéant.

Pour chaque diagnostic de lésion non tumorale, le pathologiste a attribué un grade de sévérité :

- grade 1 : sévérité minimale,
- grade 2 : sévérité légère,
- grade 3 : sévérité modérée,
- grade 4 : sévérité marquée,
- grade 5 : sévérité sévère.

Pour les lésions n'ayant aucun intérêt à être gradées (kyste, ou thymus ectopique par exemple), seul le code « présent » a été rentré dans le logiciel.

Pour chaque diagnostic de tumeur, un code de Peto a été saisi (Peto *et al.*, 1980). Le système de Peto est la méthode la plus utilisée pour ajuster les données tumorales d'une étude de cancérogenèse en fonction de la mortalité. Cet ajustement est indispensable pour les analyses statistiques des tumeurs réalisées à la fin de l'étude. Pour chaque tumeur observée chez un animal trouvé mort ou Euthanasié en cours d'étude, le pathologiste a classé cette tumeur dans l'une des 4 catégories suivantes :

- observée *in life* : tumeur observée du vivant de l'animal et pour laquelle une date d'apparition a été notée (ex. : fibrosarcome sous-cutané),
- incidentale : tumeur découverte à l'autopsie et n'ayant pas contribué à la mort ou au statut moribond de l'animal (ex. : adénome des îlots de Langerhans du pancréas),
- rapidement fatale : tumeur découverte à l'autopsie, ayant contribué à la mort ou au statut moribond de l'animal, et dont l'évolution a été rapide (ex. : lymphome de haut grade de malignité),

- non rapidement fatale : tumeur découverte à l'autopsie, ayant contribué à la mort ou au statut moribond de l'animal, et dont l'évolution a été lente (ex. : lymphome de bas grade de malignité).

Dans la mesure du possible, une cause de mortalité a été déterminée pour tous les animaux morts en cours d'étude ou euthanasiés prématurément (Long, 2004).

Pour chaque étude, une « *peer review* », c'est-à-dire une lecture par un second pathologiste, a été réalisée sur les lames suivantes :

- tous les organes de 10% des animaux des groupes contrôles et forte dose,
- les organes cibles dans tous les groupes,
- toutes les lésions hyperplasiques et toutes les tumeurs dans tous les groupes.

Les diagnostics retenus dans le rapport final représentent un consensus entre les deux pathologistes.

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

I. SURVIE ET CAUSES DE MORTALITE

A. Analyse de la survie

1) Résultats

Le taux de survie moyen des souris C57BL/6 au cours des 7 études de cancérogénèse a été assez semblable dans les deux sexes. On a observé (**Figure 3**):

- une mortalité sporadique entre le début de l'étude et 52 semaines (taux de survie de 95.7% chez les mâles et 93.4% chez les femelles),
- une mortalité plutôt faible entre 52 et 65 semaines (taux de survie de 93.1% chez les mâles et 90.9% chez les femelles),
- une accélération de la mortalité entre 65 et 78 semaines ; le taux de survie moyen à la fin de l'étude est resté élevé dans les deux sexes (81.7% chez les mâles et 83.7% chez les femelles).

La variation du taux de survie des souris C57BL/6 en fonction des 7 études de cancérogénèse a augmenté avec le temps dans les deux sexes et les écarts entre les études ont été plus importants chez les femelles que chez les mâles (voir **Annexes 1 et 2**).

On a observé (**Figure 4 et Figure 5**) :

- un taux de survie à 52 semaines compris entre 94 et 98% chez les mâles et entre 88 et 100% chez les femelles,
- un taux de survie à 65 semaines compris entre 88 et 98% chez les mâles et entre 84 et 98% chez les femelles,
- un taux de survie à 78 semaines compris entre 76 et 90% chez les mâles et entre 70 et 92% chez les femelles.

Figure 3 : Taux de survie moyen des animaux en fonction du temps

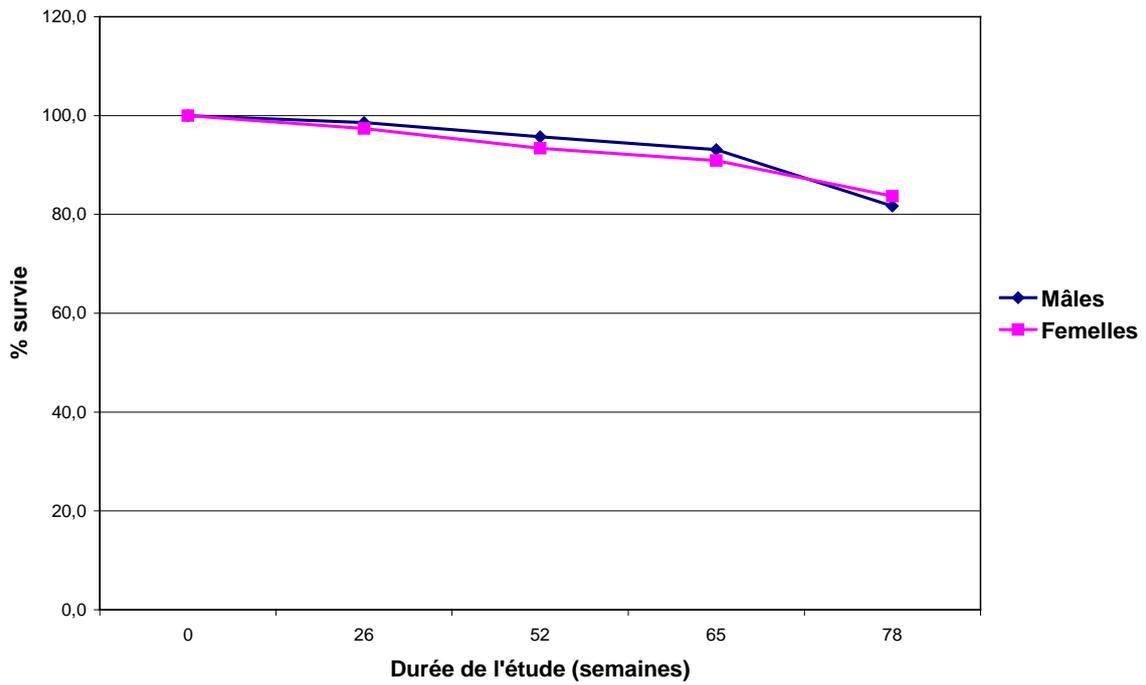


Figure 4 : Taux de survie des mâles au cours des 7 études de cancérogenèse [A-G] en fonction du temps

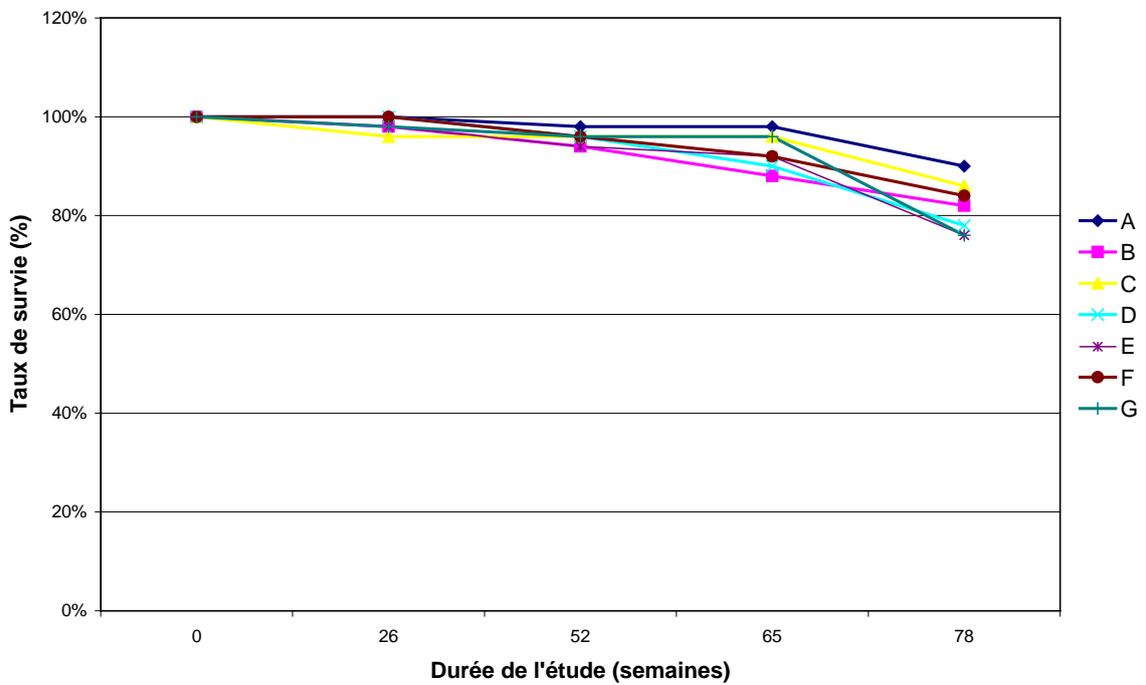
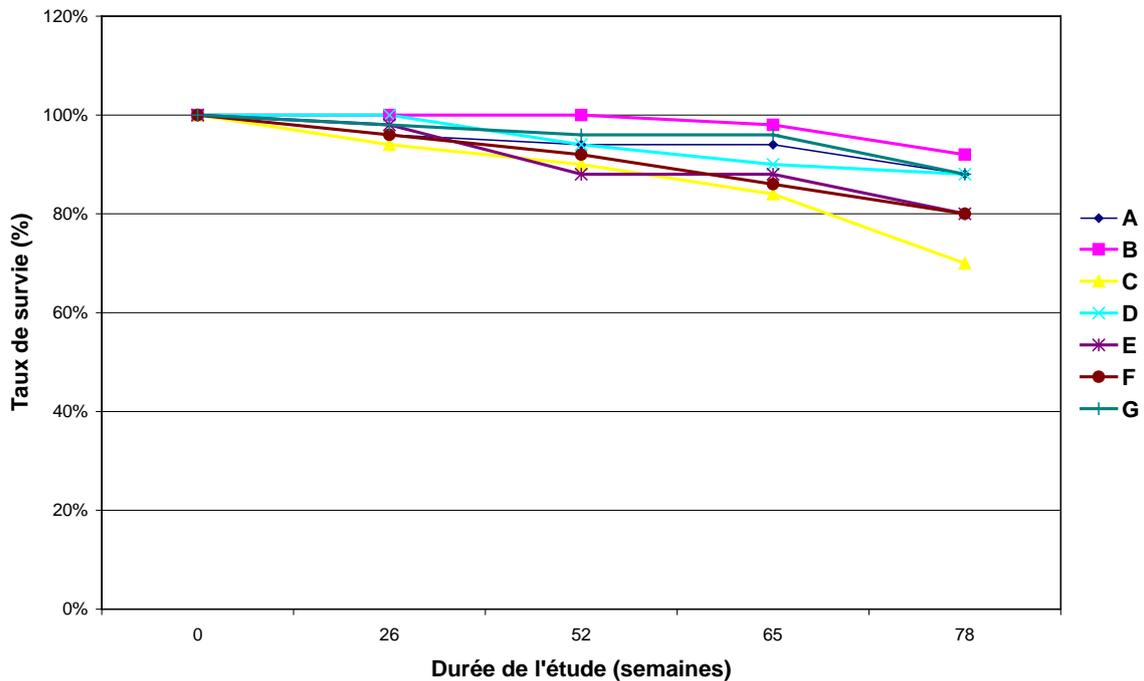


Figure 5 : Taux de survie des femelles au cours des 7 études de cancérogénèse [A-G] en fonction du temps



2) Discussion

Chez la souche CD-1 (Giknis et Clifford, 2005), le taux moyen de survie au cours des études de cancérogénèse d'une durée de 78 semaines est de :

- 73.6% chez les mâles (de 62 à 94% selon les études),
- 71.8 chez les femelles (de 63.3 à 81.6%).

Chez la souche B6C3F1 (Rao, 1999), le taux moyen de survie au cours des études de cancérogénèse d'une durée de 78 semaines est de :

- 97% chez les mâles,
- 95.3 chez les femelles.

On peut donc en conclure que :

- le taux de survie moyen observé chez la C57BL/6 au cours de nos études est compris entre les deux (81.7 et 83.7% chez les mâles et les femelles respectivement),
- il n'existe pas de différence de survie entre les mâles et les femelles dans les 3 souches.

B. Causes de mortalité

1) Résultats

Parmi les animaux morts avant la fin de l'étude, le nombre d'animaux euthanasiés pour raison éthique a été supérieur à celui des animaux trouvés morts pour les deux sexes (voir **Tableau 4**). De plus, les pourcentages ont été assez semblables pour les deux sexes.

Parmi les causes de mort, on a observé :

- une cause de mort « non tumorale » dans plus de la moitié des cas dans les deux sexes,
- une proportion de causes de mort « non déterminées » plus importantes chez les mâles que chez les femelles,
- une proportion de causes de mort « tumorales » plus importantes chez les femelles que chez les mâles.

Le détail des causes de mort observées pour chaque étude est présenté en annexe (**Annexe 3** à **Annexe 6**).

La cause de mort la plus fréquente dans les deux sexes a été la dermatite ulcéreuse chronique. Dans ce cas, il s'agit plutôt d'une cause de « sortie » puisque les animaux ont été euthanasiés pour raison éthique.

Les causes de mort ou de « sortie » les plus fréquentes chez les mâles (incidence \geq 5%) ont été (voir **Figure 6** et **Figure 8**) :

- une dermatite ulcéreuse chronique (20%),
- un mauvais état général (13%),
- une thrombose atriale (5%),
- un fibrosarcome sous-cutané (5%).

Les causes de mort ou de « sortie » les plus fréquentes chez les femelles (incidence \geq 5%) ont été (voir **Figure 7** et **Figure 9**) :

- une dermatite ulcéreuse chronique (28%),
- un mauvais état général (14%),
- un fibrosarcome sous-cutané (12%),
- un lymphome malin (11%),
- un sarcome sous-cutané (7%).

Parmi les autres causes de mort, dont l'incidence a été comprise entre 2 et 3%, on a observé :

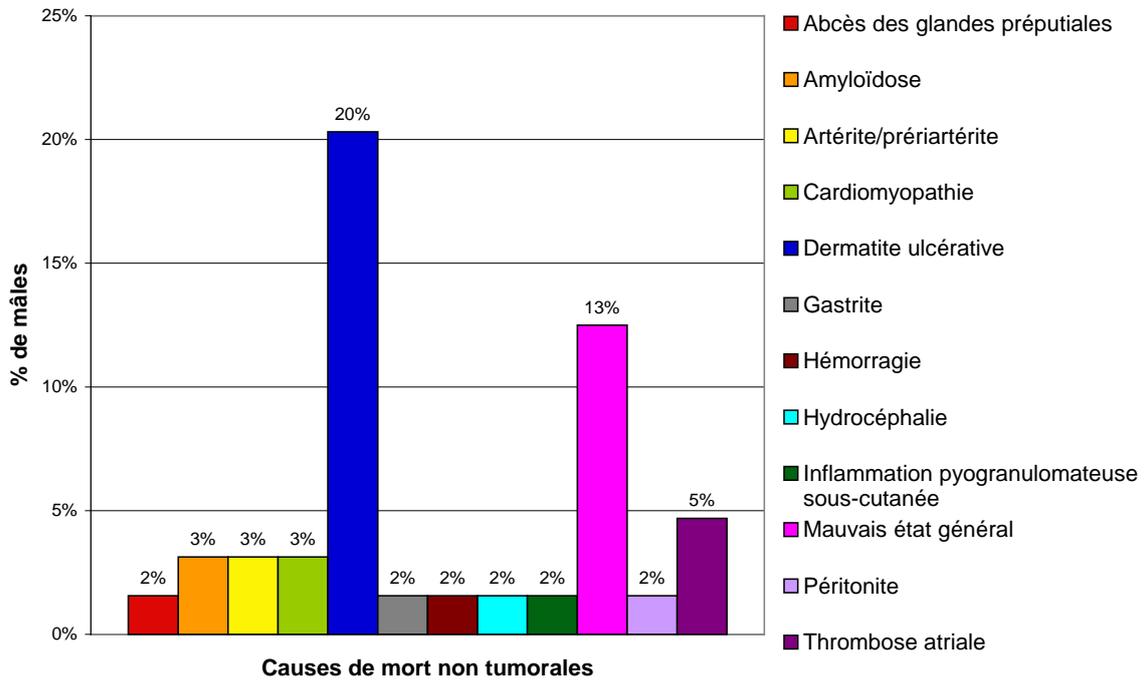
- des causes non tumorales : amyloïdose, artérite/périartérite, cardiomyopathie, inflammation pyogranulomateuse sous-cutanée, abcès des glandes préputiales, péritonite ou septicémie...
- des causes tumorales : hémangiosarcome, phéochromocytome, sarcome histiocytaire, tumeur cutanée, tumeur digestive...

Un cas de lésion congénitale (hydrocéphalie) a été observé chez un mâle (sorti de l'étude le 3^e jour).

Tableau 4 : Incidence de la mortalité et des causes de mort rencontrées au cours des 7 études de cancérogenèse

	<i>Mâles</i>	<i>Femelles</i>
Nombre total d'animaux	350	350
Nombre d'animaux morts avant la fin de l'étude (% par rapport au nombre total)	64 (18%)	57 (16%)
Nombre d'animaux trouvés morts (% par rapport au nombre total)	19 (5%)	7 (2%)
Nombres d'animaux euthanasiés pour éthique (% par rapport au nombre total)	45 (13%)	49 (14%)
Cause de mort non déterminée (% par rapport au nombre d'animaux morts)	20 (31%)	6 (11%)
Cause de mort non tumorale (% par rapport au nombre d'animaux morts)	36 (56%)	30 (53%)
Cause de mort tumorale (% par rapport au nombre d'animaux morts)	8 (13%)	21 (37%)

**Figure 6 : Incidence des causes de mort non tumorales observées chez les mâles
(% par rapport au nombre total de morts)**



**Figure 7 : Incidence des causes de mort non tumorales observées chez les femelles
(% par rapport au nombre total de morts)**

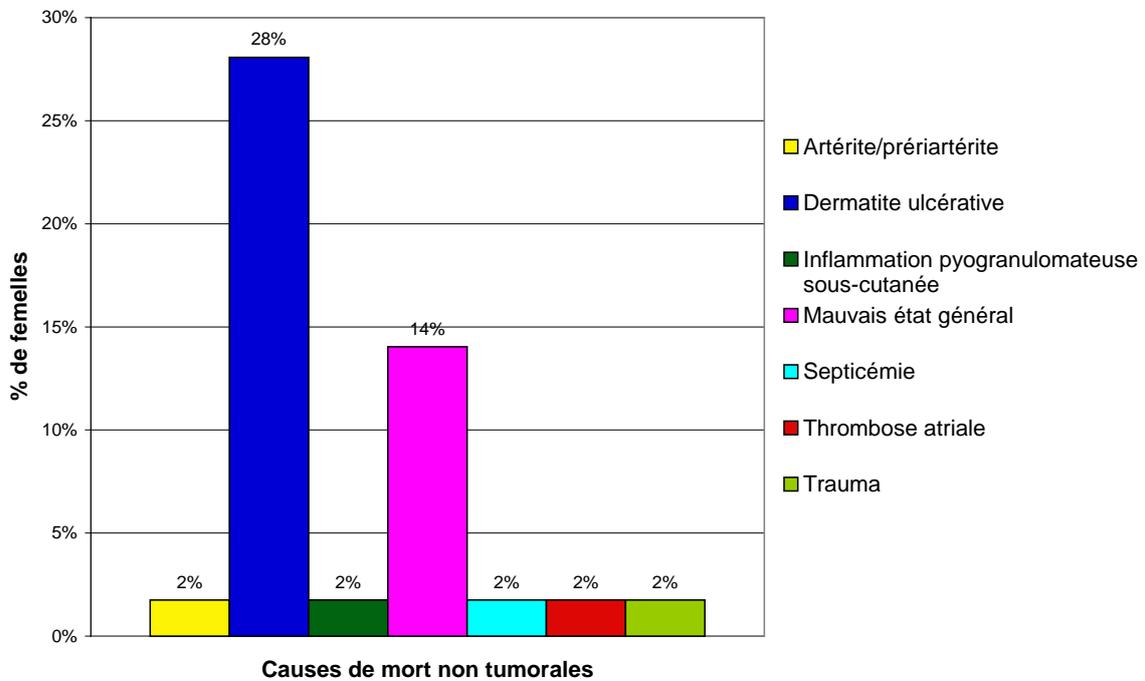


Figure 8 : Incidence des causes de mort tumorales observées chez les mâles
 (% par rapport au nombre total de morts)

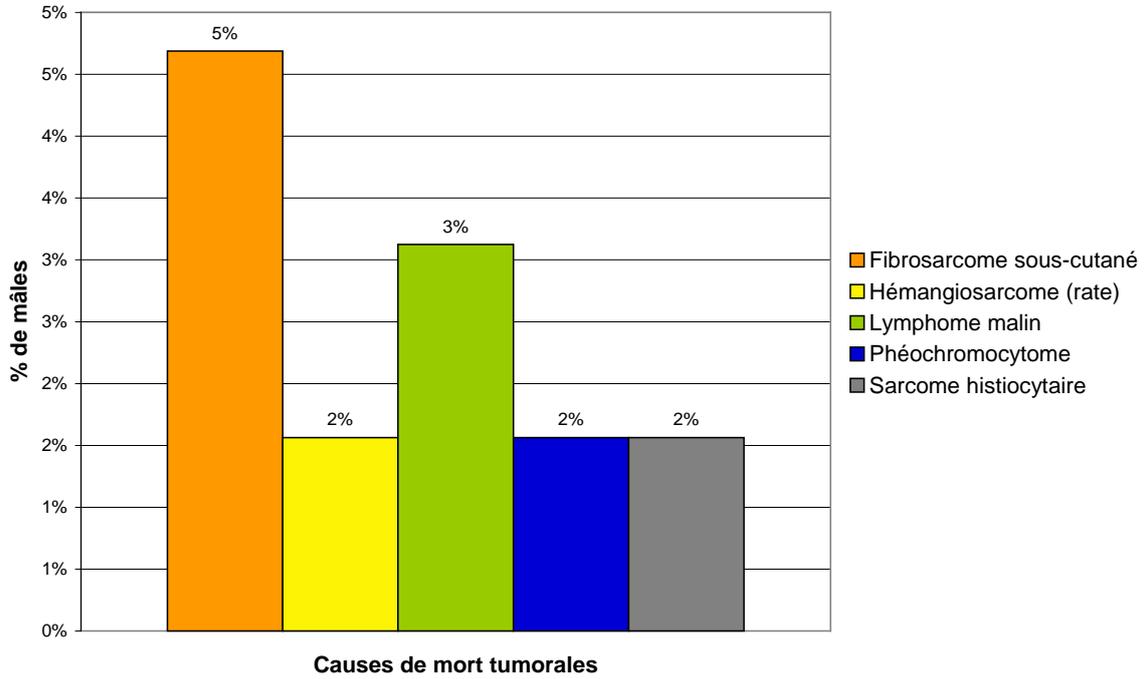
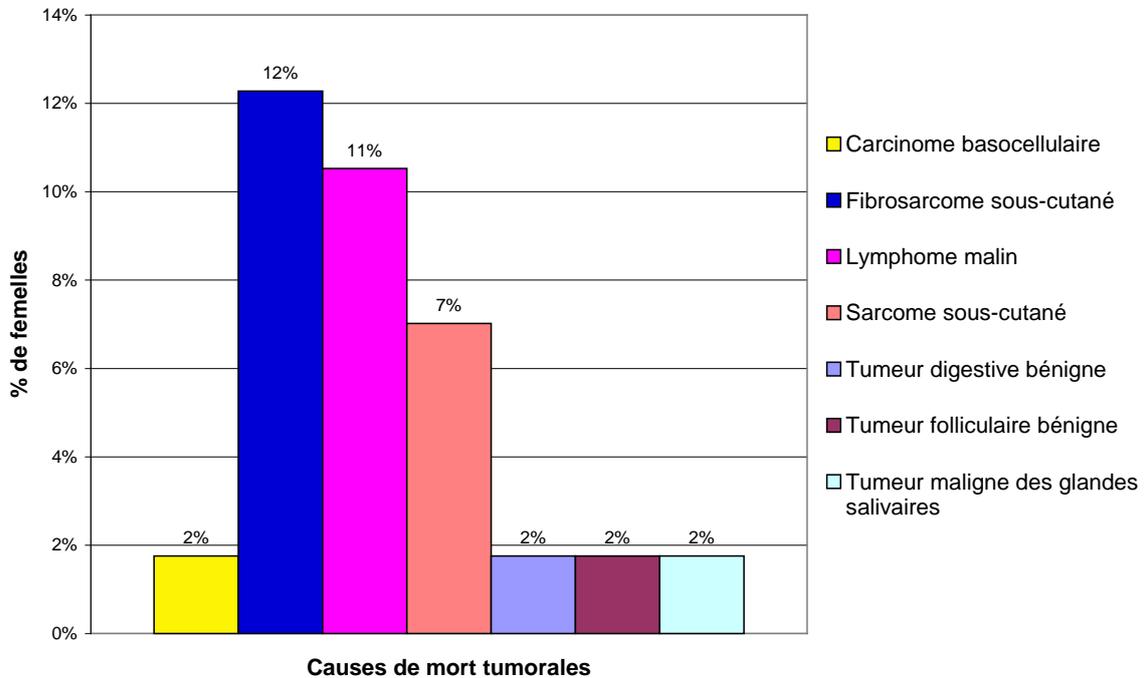


Figure 9 : Incidence des causes de mort tumorales observées chez les femelles
 (% par rapport au nombre total de morts)



2) Discussion

L'attribution d'une cause de mort ou d'une cause de sacrifice avant la fin de l'étude par le pathologiste est essentielle pour l'interprétation finale des données. Très peu de publications font référence aux causes de mort rencontrées au cours des études de cancérogenèse.

Chez la souche CD-1, les causes de mort principalement rapportées dans les deux sexes (Maita *et al.*, 1988) sont : l'artérite/périartérite, l'amyloïdose, la thrombose atriale, la néphropathie chronique, les tumeurs hématolymphopoiétiques et les tumeurs du poumon. De plus, les tumeurs hépatiques chez les mâles et les tumeurs mammaires chez les femelles ont été aussi des causes de mort fréquentes (35,5% et 7% respectivement).

Chez la souche NMRI (souche non consanguine dérivée de la CD-1), la cause de mort a été (Ettlin *et al.*, 1994) :

- non déterminée dans 27.4% des cas,
- d'origine tumorale dans 52% des cas,
- d'origine non tumorale dans 20.6% des cas.

Parmi les causes tumorales, les auteurs ont rapporté une majorité de tumeurs hématolymphopoiétiques, puis des tumeurs pulmonaires et des tumeurs hépatiques (mâles uniquement). Les principales causes de mort non tumorales ont été la glomérulopathie chronique et la dermatite ulcéreuse chronique.

En conclusion, les causes de mort rapportées chez la souris CD-1 sont comparables à celles que nous avons observées chez la C57BL/6, c'est-à-dire principalement d'origine non tumorales (contrairement à la souche NMRI). Par contre, dans le détail, les pathologies ont été assez différentes, la dermatite ulcéreuse n'ayant pas été observée chez la souris CD-1 ; ceci s'explique par le fait que cette entité est très fréquente chez les souris au pelage noir comme la C57BL/6 (Andrews *et al.*, 1994). L'amyloïdose systémique, pourtant souvent observée au cours de nos 7 études, n'a représenté une cause de mort que dans 3% des cas chez les mâles C57BL/6, alors qu'il s'agit de la 2^e cause de mort chez la souris CD-1 dans les deux sexes.

II. LÉSIONS NON TUMORALES

A. Lésions systémiques

1) Amyloïdose

◆ Résultats

Un dépôt de substance amyloïde a été observé dans de multiples organes dans les deux sexes, avec une incidence variable selon les organes (**Tableau 5** ci-dessous).

Tableau 5: Incidence de l'amyloïdose dans différents organes

<i>Organe</i>	<i>Mâles</i>				<i>Femelles</i>			
	Incidence totale	% total	% min.	% max.	Incidence totale	% total	% min.	% max.
<i>Caecum</i>	195/331	58,9	0	96	165/346	47,7	2	92
<i>Cœur</i>	200/350	57,1	0	84	170/350	48,6	0	84
<i>Colon</i>	154/338	45,6	0	69	141/348	40,5	0	76
<i>Estomac</i>	169/344	49,1	6	94	142/347	40,9	0	80
<i>Foie</i>	99/348	28,4	0	56	23/350	6,6	0	30
<i>Glande parathyroïde</i>	98/296	33,1	0	55	118/305	38,7	0	84
<i>Glande surrénale</i>	210/344	61,0	0	94	142/348	40,8	0	94
<i>Glande thyroïde</i>	183/345	53,0	0	76	172/346	49,7	0	82
<i>Iléum</i>	238/341	69,8	0	100	243/344	70,6	0	98
<i>Jéjunum</i>	24/336	7,1	0	40	7/345	2,0	0	10
<i>Nœud lymphatique mésentérique</i>	177/330	53,6	0	88	171/342	50,0	0	84
<i>Rate</i>	13/343	3,8	0	12	1/349	0,3	0	2
<i>Rein</i>	193/349	55,3	0	92	127/350	36,3	0	76
<i>Utérus</i>					212/349	60,7	0	88

Les organes les plus touchés ont été :

- l'iléum dans les deux sexes,
- puis le caecum, le rein et la glande surrénale chez les mâles,
- l'utérus, le caecum et les nœuds lymphatiques mésentériques chez les femelles.

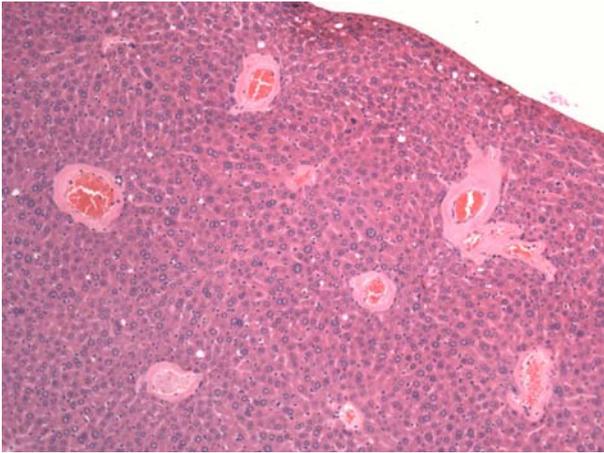
Des différences importantes ont été observées entre les deux sexes ; d'une manière générale, l'incidence a été plus importante chez les mâles que chez les femelles. C'est le cas en particulier pour certains organes comme le foie, le rein et la glande surrénale.

Histologiquement, on a observé le dépôt d'une substance amorphe, discrètement fibrillaire et éosinophile sur les sections colorées en HE. La localisation des dépôts a été variable selon l'organe :

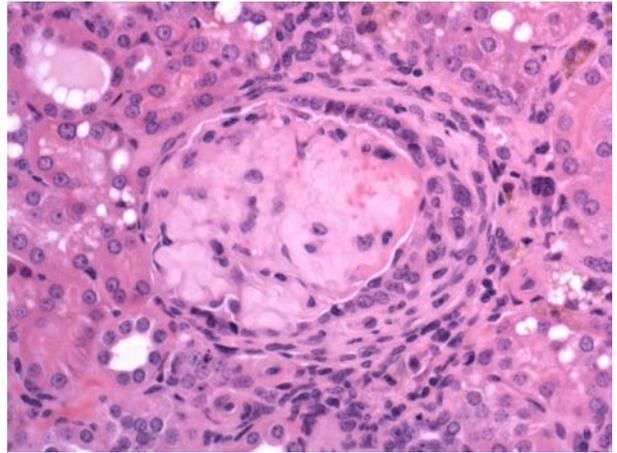
- foie : autour des vaisseaux des espaces portes (**Figure 10-A, B**),
- rein : principalement dans les glomérules (**Figure 10-C, D**), mais aussi dans l'interstitium de la médullaire et de la papille,
- glandes thyroïdes et parathyroïdes : au sein de l'interstitium, avec une atrophie plus ou moins importante des follicules thyroïdiens (**Figure 10-E**),
- glande surrénale : au sein du cortex profond puis progression dans la zone fasciculée, avec atrophie secondaire du cortex (**Figure 10-F**),
- cœur : au sein de l'interstitium, surtout au niveau des ventricules (**Figure 10-G**) et au niveau des valvules atrio-ventriculaires (**Figure 10-H**),
- rate : au sein de la pulpe rouge autour de la zone marginale, avec remplacement de la pulpe rouge et atrophie secondaire de la pulpe blanche dans les cas les plus sévères,
- tube digestif (estomac glandulaire, iléum, caecum) : dans le chorion de la muqueuse et dans la sous-muqueuse, avec épaissement et raccourcissement des villosités de l'iléum (**Figure 10-I, J**),
- nœuds lymphatiques mésentériques : au niveau des sinus sous-capsulaires puis paracorticaux.

En cas d'amyloïdose sévère du rein avec des dépôts dans l'interstitium de la papille, une nécrose de la papille a parfois été observée chez les mâles uniquement (voir **Tableau 10**) (**Figure 10-K, L**).

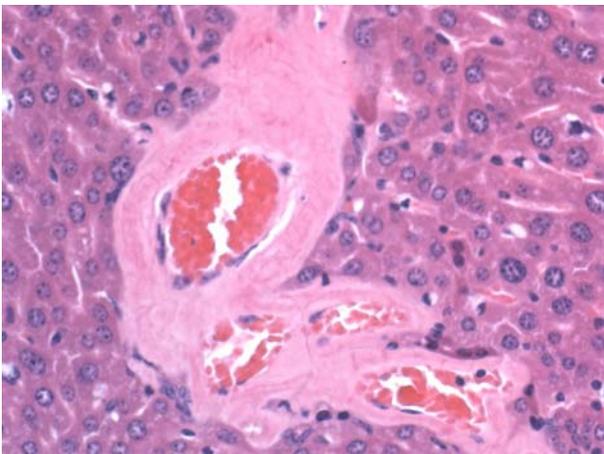
Figure 10 : Lésions d'amyloïdose. Dépôt de substance amyloïde dans différents organes (A à F)



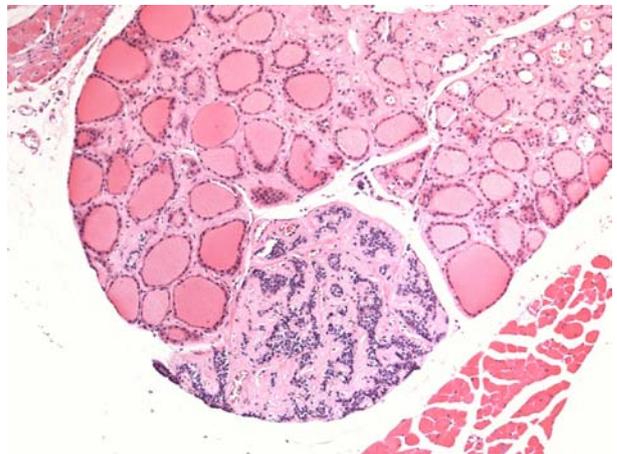
A : Autour des espaces portes (foie, HE, x10)



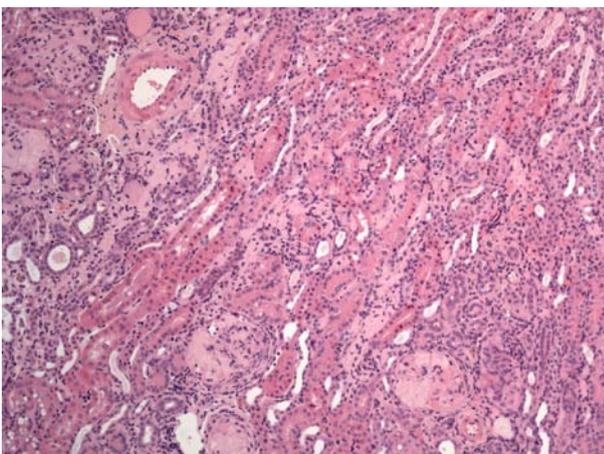
D : Dans le glomérule (rein, HE, x40)



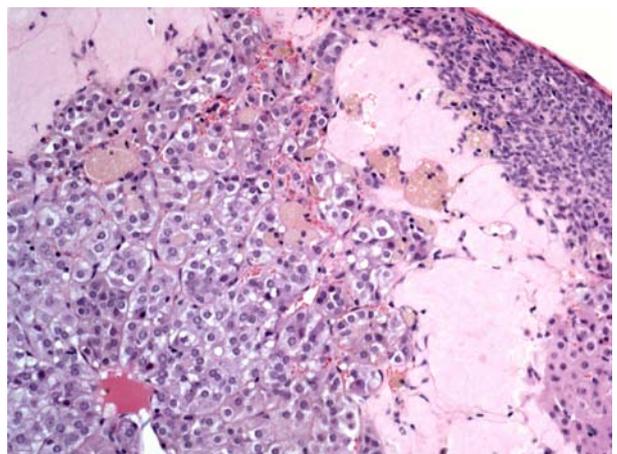
B : Autour des espaces portes (foie, HE, x40)



E : Dans les glandes thyroïdes et parathyroïdes (HE, x10)

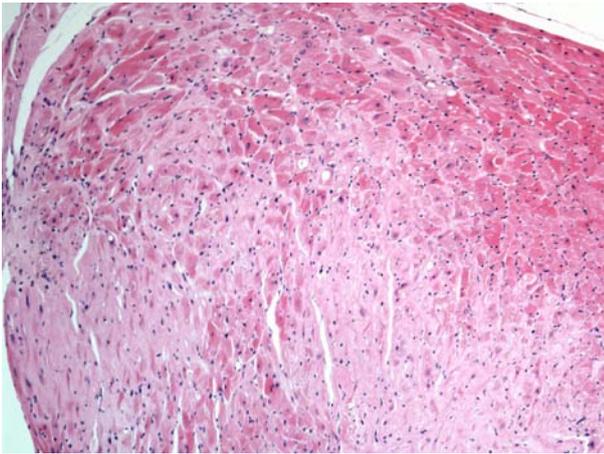


C : Au sein du cortex rénal (rein, HE, x10)

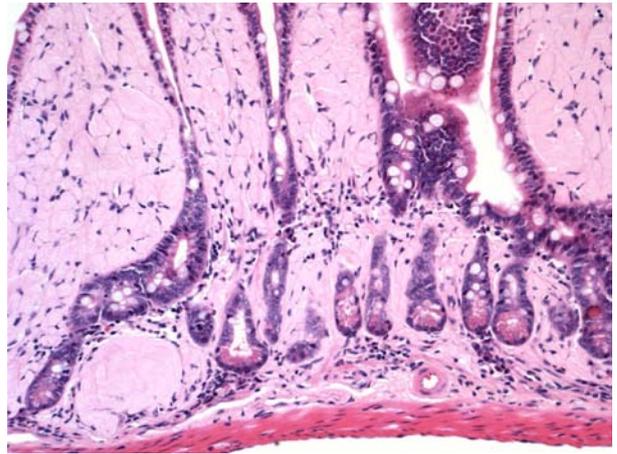


F : Dans le cortex surrénalien (glande surrénale, HE, x20)

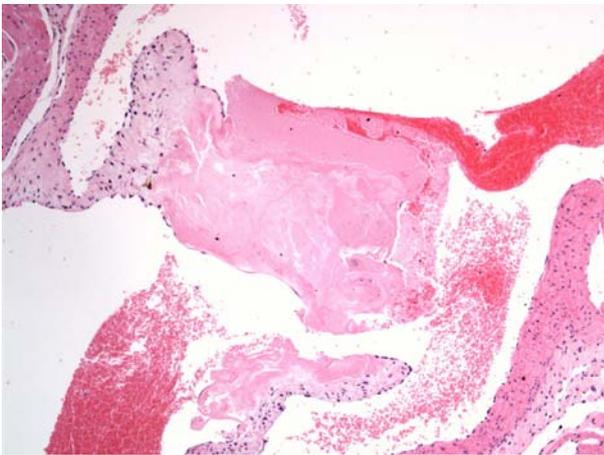
Figure 10 (suite): Lésions d'amyloïdose. Dépôt de substance amyloïde dans différents organes (G à L)



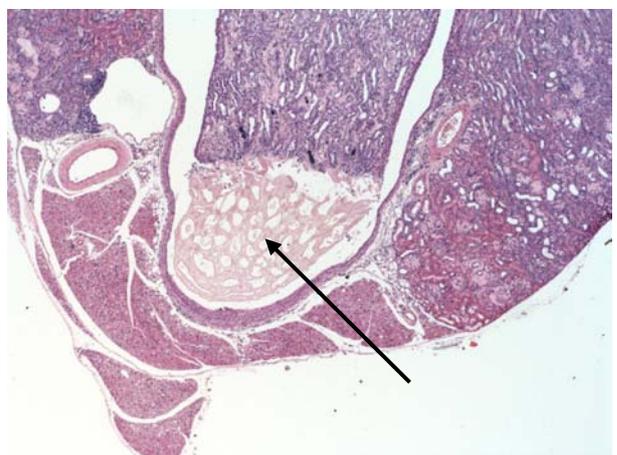
G : Dans le myocarde ventriculaire (cœur, HE, x10)



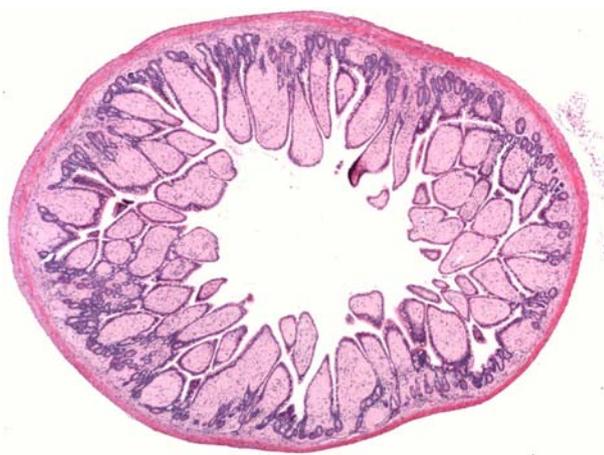
J : Dans l'iléum (HE, x20)



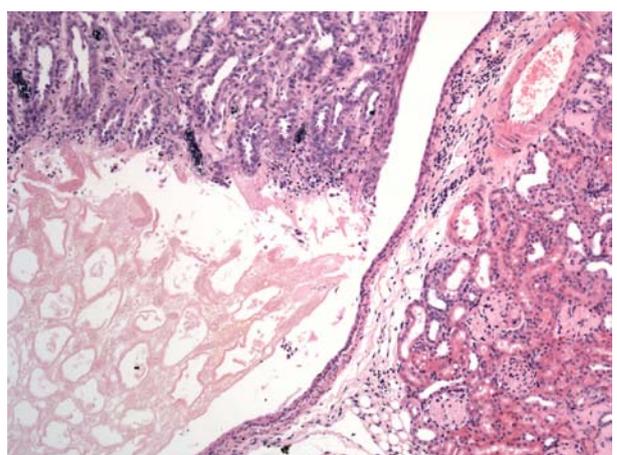
H : Dans une valvule atrio-ventriculaire (cœur, HE, x10)



K : Nécrose de la papille rénale (flèche) associée à une amyloïdose (rein, HE, x4)



I : Dans l'iléum (HE, x4)



L : Nécrose de la papille rénale associée à une amyloïdose (rein, HE, x10)

◆ Discussion

L'amyloïdose est une pathologie spontanée bien décrite chez la souris et l'incidence est variable selon la souche, l'âge et le sexe (Hogenesch *et al.*, 1996). La C57BL/6 est l'une des souches les plus touchées. L'amyloïdose est une lésion liée à l'âge, mais elle est aussi influencée par les conditions de laboratoire, comme l'hébergement et le statut pathogène : l'incidence diminue si les animaux sont hébergés dans des cages individuelles dans une animalerie SPF (Lipman *et al.*, 1993). L'incidence de la lésion peut également varier selon le fournisseur au sein d'une même souche (Engelhardt *et al.*, 1993).

Au cours de nos études, on a pu observer une très grande variabilité d'une étude à l'autre, d'un organe à l'autre et d'un sexe à l'autre (0 à 100% des animaux atteints pour l'iléum par exemple). Pourtant, les conditions de laboratoire, le fournisseur d'animaux ainsi que la nourriture ont été les mêmes pour toutes les études.

Dans le rein, le diagnostic différentiel doit se faire avec :

- une sclérose glomérulaire,
- une glomérulopathie hyaline (dans ce cas le dépôt est positif avec la coloration de PAS).

Le diagnostic de certitude peut se faire grâce à une coloration spéciale au Rouge Congo : les dépôts apparaissent rouges en HE et sont biréfringents en lumière polarisée. Dans ce travail, cette coloration n'a pas été nécessaire puisque l'entité est très fréquente dans cette souche. De plus, la distribution systémique dans de multiples organes est caractéristique de l'amyloïdose.

La nature du dépôt d'amyloïde sur coupes histologiques peut être déterminée grâce à un marquage immuno-histochimique. Deux types de dépôts d'amyloïde ont été décrits chez la souris : le type AA et le type AapoAII . L'amyloïdose AA peut être induite expérimentalement par injection de caséine ou par d'autres stimuli inflammatoires. Ce type d'amyloïdose est associé à des processus inflammatoires chez la souris âgée. L'amyloïdose AapoAII a été identifiée pour la première fois chez la souris SAM (*senescence-accelerated mouse*), puis elle a été démontrée chez onze souches de souris âgée, dont la C57BL/6 (Higuchi *et al.*, 1991).

2) Artérite/périartérite

◆ Résultats

Des lésions d'artérite et/ou de périartérite ont été observées dans les deux sexes avec une incidence variable selon les organes (**Tableau 6**). Les lésions ont en général été observées dans plusieurs organes chez un même animal (polyartérite). Les organes les plus souvent touchés ont été :

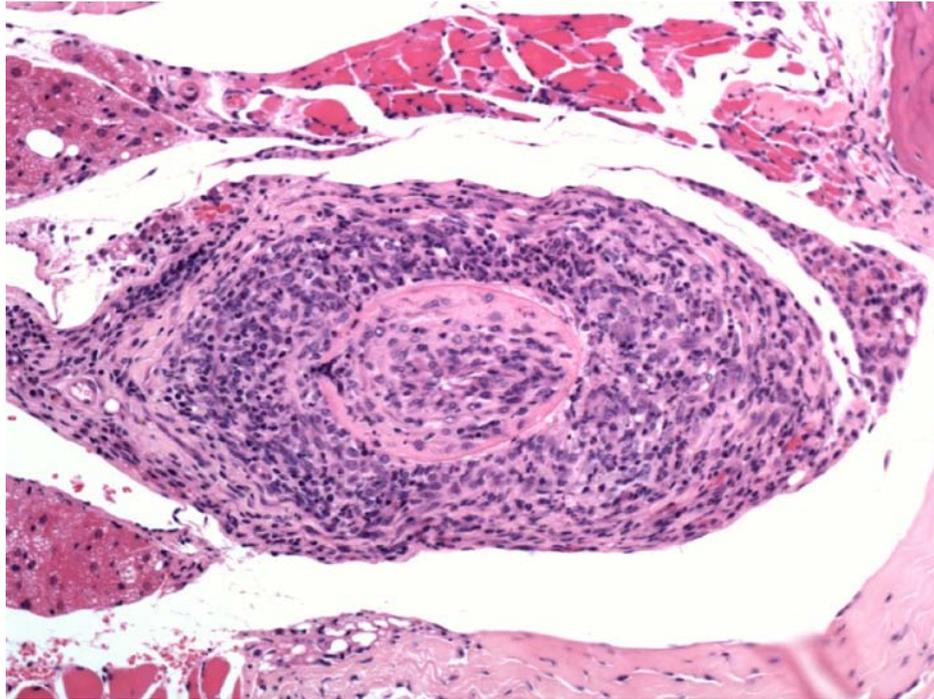
- les vésicules séminales, le cœur et la prostate chez les mâles,
- la colonne vertébrale, la langue et le cœur chez les femelles.

Tableau 6: Incidence des lésions d'artérite/périartérite

<i>Organe</i>	<i>Mâles</i>				<i>Femelles</i>			
	Incidence totale	% total	% min.	% max.	Incidence totale	% total	% min.	% max.
<i>Articulation fémoro-tibiale</i>	1/345	0.3	0	2	2/344	0.6	0	2
<i>Cœur</i>	7/350	2.0	0	4	6/350	1.7	0	6
<i>Colonne vertébrale</i>	3/349	0.9	0	4	9/348	2.6	0	10
<i>Encéphale</i>	0/350	0	0	0	1/350	0.3	0	2
<i>Epididyme</i>	1/350	0.3	0	2				
<i>Estomac</i>	6/344	1.7	0	4	7/347	2.0	0	6
<i>Glande thyroïde</i>	4/345	1.2	0	4	3/346	0.9	0	4
<i>Iléum</i>	0/341	0	0	0	1/344	0.3	0	2
<i>Langue</i>	3/350	0.9	0	4	8/349	2.3	0	8
<i>Ovaire</i>					2/348	0.6	0	4
<i>Pancréas</i>	2/345	0.6	0	2	0/350	0	0	0
<i>Prostate</i>	5/344	1.5	0	4				
<i>Nerf sciatique</i>	1/346	0.3	0	2	2/347	0.6	0	2
<i>Nœud lymphatique Mésentérique</i>	0/330	0	0	0	4/342	1.2	0	6
<i>Utérus</i>					2/349	0.6	0	2
<i>Vagin</i>					2/343	0.6	0	4
<i>Vésicules séminales</i>	13/350	3.7	0	12				

Les lésions, présentes dans les artères de petit à moyen calibre, ont été caractérisées histologiquement par une nécrose fibrinoïde de la média et par une infiltration par des granulocytes neutrophiles, des lymphocytes et des plasmocytes, dans une ou plusieurs des différentes tuniques de l'artère (artérite) et/ou en périphérie (périartérite) (**Figure 11**). Une hyperplasie des fibres musculaires de la média ainsi qu'une fibrose de la paroi des vaisseaux ont pu être observées.

Figure 11: Lésion d'artérite sévère touchant une artère de petit calibre dans le tissu interstitiel à la périphérie de la colonne vertébrale (HE, x20)



◆ Discussion

Ces lésions spontanées sont décrites chez différentes souches de souris avec une prédilection pour le pancréas, le cœur, le mésentère, le tractus digestif et l'appareil génital (Elwell et Mahler, 1999).

L'étiologie reste inconnue mais une origine auto-immune est supposée chez certaines souches (Plendl *et al.*, 1996).

Les lésions systémiques d'artérite peuvent être une cause de mort ou de sortie prématurée de l'animal ; ceci a été le cas chez seulement 3% des mâles et 2% des femelles dans nos études (voir §I.A.2).

3) Minéralisations dystrophiques

◆ Résultats

Des minéralisations dystrophiques ont été observées occasionnellement dans de nombreux organes, mais les organes les plus fréquemment touchés ont été :

- le rein (60.6% des mâles et 60.4% des femelles) (**Tableau 10**),
- le cerveau (45.2% des mâles et 37.2% des femelles) (**Tableau 16**),
- le cœur (18.8% des mâles et 12.8% des femelles) (**Tableau 13**).

Histologiquement, des dépôts basophiles granuleux ont été observés dans la papille rénale, le thalamus et les muscles papillaires cardiaques. Dans la papille rénale, les dépôts étaient intra-tubulaires (**Figure 12-A**). Dans le thalamus, les dépôts étaient extra-cellulaires et bilatéraux symétriques (**Figure 12-B,C**). Dans les muscles papillaires cardiaques, les dépôts minéralisés étaient présents au sein de fibres myocardiques nécrotiques (**Figure 12-D**).

◆ Discussion

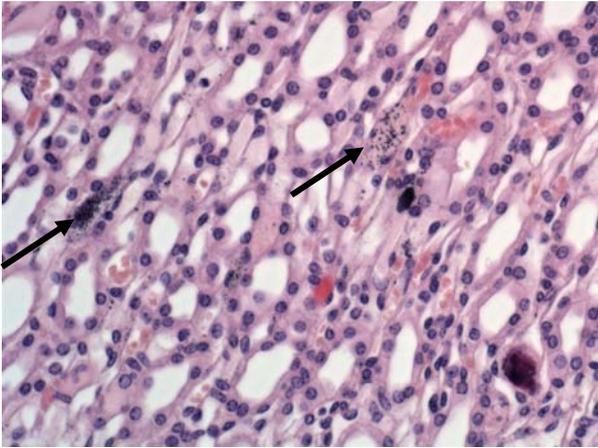
Dans le **rein**, les minéralisations sont variables selon les souches et une prédisposition des mâles par rapport aux femelles a été observée chez la souche B6C3F1 (Seely, 1999). Dans cette souche, les dépôts ont été le plus souvent localisés à la jonction cortico-médullaire, dans les cellules tubulaires ou le long des membranes basales vasculaires. Des dépôts intra-tubulaires ont également été observés dans l'anse de Henlé. Les dépôts les plus importants peuvent entraîner une ectasie tubulaire et/ou une nécrose tubulaire. La pathogénie de la minéralisation rénale est complexe et a été associée à des concentrations sériques élevées de calcium et de magnésium et à l'influence des hormones parathyroïdiennes et des métabolites de la vitamine D.

Dans le **cerveau**, la minéralisation bilatérale du thalamus est une lésion spontanée assez fréquente dont l'incidence augmente avec l'âge chez la souris B6C3F1 ou dans d'autres souches (Morgan *et al.*, 1982). Les dépôts extracellulaires seraient développés sur des membranes basales de petits vaisseaux et contiendraient du calcium et du phosphore.

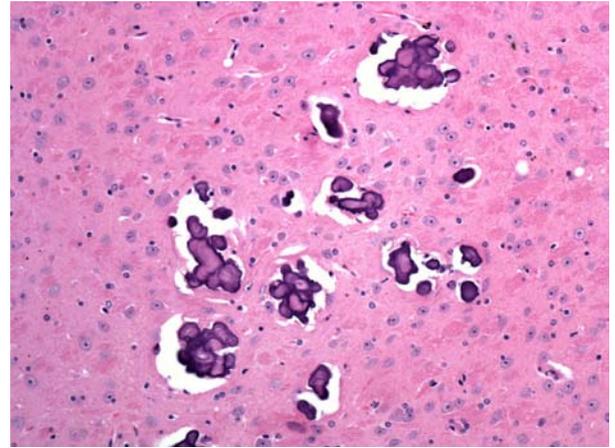
Dans le **cœur**, les minéralisations sont considérées comme déterminées génétiquement avec une variabilité très importante selon les souches, et au sein d'une même souche, avec une variabilité selon l'âge, le sexe et le régime alimentaire (Faccini *et al.*, 1990).

Ces minéralisations, le plus souvent observées avec une sévérité minimale à légère, n'ont pas de conséquence fonctionnelle en général.

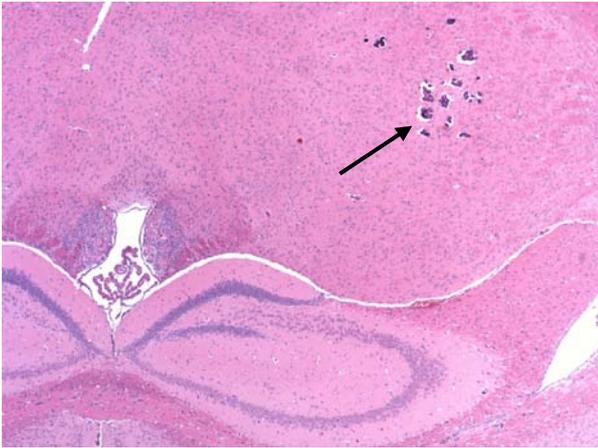
Figure 12 : Lésions de minéralisation dystrophiques (A à D)



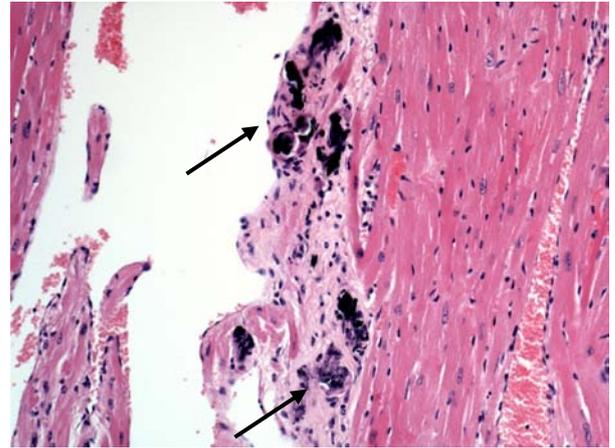
A : minéralisation dans la médullaire rénale (HE, x40)



C: dépôts de minéraux dans le thalamus (cerveau, HE, x20)



B : dépôts de minéraux dans le thalamus (flèche) (cerveau, HE, x4)



D: minéralisation des muscles papillaires (flèches) (cœur, HE, x20)

B. Lésions de l'appareil digestif

1) Foie

◆ Résultats

L'incidence des lésions spontanées observées dans le foie est présentée dans le tableau ci-dessous (**Tableau 7**).

Tableau 7: Incidence des lésions observées dans le foie

<i>Lésion</i>	<i>Mâles</i>				<i>Femelles</i>			
	Incidence Totale (sur 348)	% total	% min.	% max.	Incidence Totale (sur 350)	% total	% min.	% max.
<i>Ectasie sinusoïdale</i>	0	0,0	0	0	3	0.9	0	4
<i>Foyer(s) de nécrose hépatocellulaire</i>	47	13.5	4	36	34	9,7	2	20
<i>Hématopoïèse extra-médullaire</i>	8	2,3	0	6	29	8.3	2	12
<i>Hépatite chronique</i>	11	3.2	0	10	8	2,3	0	4
<i>Hyperplasie des cellules ovoides</i>	11	3.2	0	10	7	2.0	0	8
<i>Hypertrophie/hyperplasie des cellules de Kupffer</i>	1	0,3	0	2	5	1.4	0	6
<i>Hyperplasie des canaux biliaires</i>	7	2.0	0	8	14	4.0	0	10
<i>Kyste(s) biliaires</i>	11	3,2	0	6	2	0,6	0	2
<i>Pigments bruns : cellules de Kupffer</i>	5	1.4	0	4	20	5.7	0	18
<i>Torsion de lobe</i>	1	0,3	0	2	2	0,6	0	4
<i>Vacuolisation hépatocellulaire : centrolobulaire</i>	85	24.4	4	80	49	14,0	2	66
<i>Vacuolisation hépatocellulaire : diffuse</i>	145	41,7	0	76	206	58.9	0	94
<i>Lipidose de tension</i>	54	15,5	6	22	75	21.4	14	38

Une vacuolisation cytoplasmique des hépatocytes a été observée avec deux topographies différentes:

- une vacuolisation diffuse intéressant tout le lobule hépatique (51 à 69% des animaux),
- une vacuolisation à prédominance centrolobulaire (16 à 27% des animaux).

Histologiquement, on a observé principalement des vacuoles claires de petite taille ne déplaçant pas le noyau (microvacuoles). Des vacuoles de grande taille déplaçant le noyau à la périphérie (macrovacuoles) ont aussi été observées.

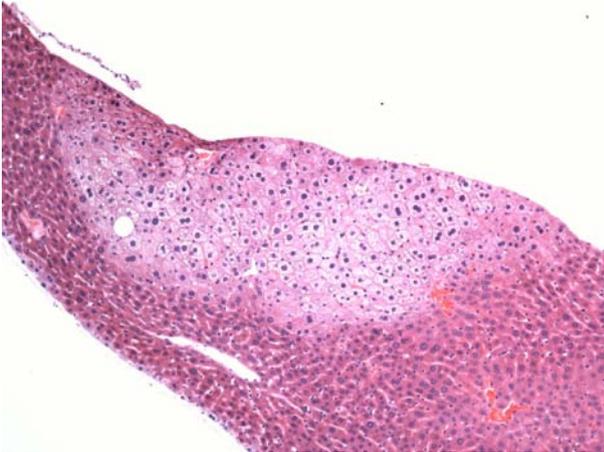
Une lésion focale particulière a été parfois observée près de l'attachement du ligament falciforme et de la vésicule biliaire et correspond à une « lipidose de tension ». Cette entité a été observée à l'autopsie sous forme d'un foyer blanchâtre ou jaunâtre dans le lobe médian chez 14.5% des mâles et 22% des femelles. Histologiquement, on a observé une vacuolisation hépatocellulaire focale à fines vacuoles dans le lobe médian (**Figure 13-A**).

Des foyers de nécrose hépatocellulaire ont été observés chez 14.9% des mâles et 9.6% des femelles. Histologiquement, les foyers étaient uniques ou multiples et distribués de façon aléatoire au sein du parenchyme hépatique. La lésion récente se présentait comme un foyer de nécrose de coagulation, les hépatocytes ayant un cytoplasme hyperéosinophile et un noyau pycnotique ou caryorrhexique (**Figure 13-B**). Dans les lésions plus avancées, les hépatocytes avaient disparu et étaient remplacés par une plage hémorragique. Une infiltration par des granulocytes neutrophiles et/ou des macrophages a pu être observée.

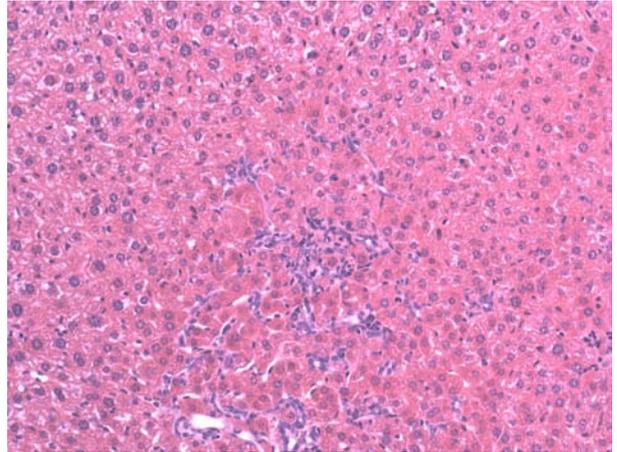
Une hépatite chronique active a été observée avec une faible incidence, de façon plus importante chez les mâles que les femelles (4.4% et 2.8% respectivement). A l'autopsie, le foie a présenté une surface irrégulière (**Figure 13-C**) et une atrophie du parenchyme plus ou moins importante. Histologiquement, on a observé une cytomégalie (plutôt centrolobulaire à médiolobulaire), une anisocytose, une hyperplasie des cellules ovoides et des canaux biliaires, un infiltrat inflammatoire périportal à cellules mononucléées et une fibrose des espaces portes (**Figure 13-D**). On a observé parfois une hypertrophie et/ou une hyperplasie des cellules de Kupffer.

Des pigments bruns intra-cytoplasmiques ont été observés dans les cellules de Kupffer, surtout chez les femelles. Ces pigments correspondent le plus souvent à des lipofuschines chez la souris âgée, mais aussi à de l'hémosidérine ou à de la bile. Seule une coloration spéciale aurait pu permettre de préciser la nature de ces pigments.

Figure 13 : Lésions observées dans le foie (A à F)



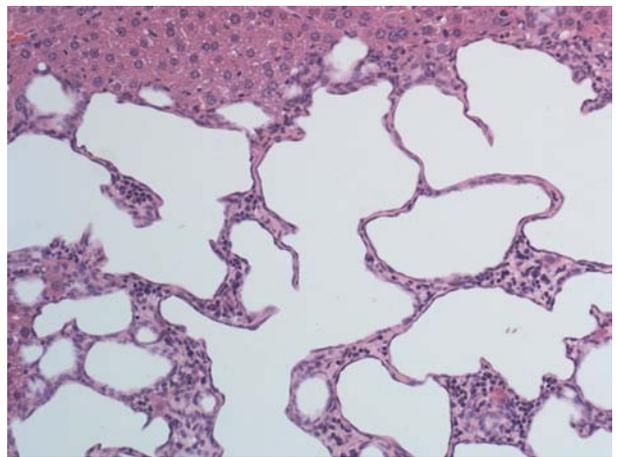
A : lipidose de tension dans le lobe médian (foie, HE, x10)



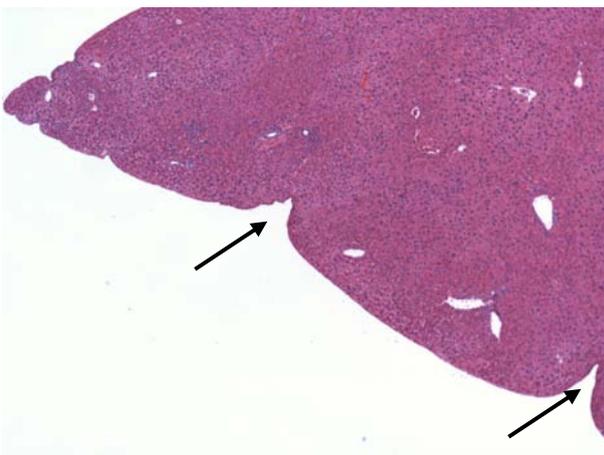
D : hyperplasie des canaux biliaires observée lors d'hépatite chronique (foie, HE, x20)



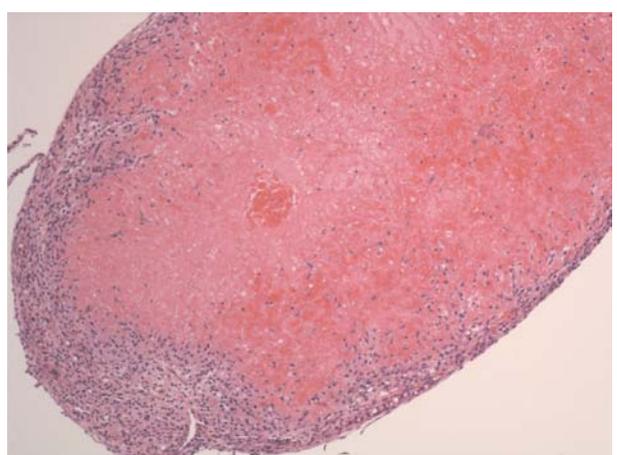
B : nécrose de coagulation autour d'une veine centro-lobulaire (foie, HE, x10)



E : kystes biliaires multiples (foie, HE, x20)



C : surface irrégulière (flèches) observée lors d'hépatite chronique (foie, HE, x4)



F : nécrose du lobe caudé suite à une torsion (foie, HE, x10)

Des kystes des canaux biliaires ont été observés avec une incidence plus forte chez les mâles (3.2% contre 0.4% chez les femelles). Histologiquement, on a observé des kystes souvent multiloculés avec séparation par de fins septa de tissu conjonctif et bordés par un épithélium cubique à aplati (**Figure 13-E**). Leur taille étaient variable et les plus volumineux étaient visibles à l'autopsie et remplis d'un liquide jaunâtre clair.

Une angiectasie focale a été observée chez 1.2% des femelles. Histologiquement, on a observé une dilatation focale plus ou moins importante des capillaires sinusoides, remplis d'hématies et bordés par des cellules endothéliales normales.

Une nécrose extensive du lobe caudé consécutive à une torsion a été observée chez un mâle. La lésion d'infarctus était caractérisée macroscopiquement par une coloration rouge sombre du lobe caudé et histologiquement par une nécrose de coagulation diffuse et une organisation périphérique avec de la fibrose dans les lésions chroniques (**Figure 13-F**).

◆ Discussion

La **vacuolisation hépatocellulaire** est une lésion fréquente chez la souris et peut être diagnostiquée sous différentes appellations : stéatose, lipidose, dépôt de lipides (Harada *et al.*, 1999). Il s'agit d'une accumulation cytoplasmique de triglycérides. La nature lipidique des vacuoles peut être confirmée par une coloration au Noir Soudan ou à l'Oil Red O sur des coupes congelées. Cette lésion spontanée est très fréquente chez la souris âgée mais elle peut aussi être secondaire à des agents hépatotoxiques: le CCl₄ induit une stéatose centrolobulaire alors que le phosphore induit une stéatose périportale, par exemple. La topographie lobulaire dépend du site de l'activation métabolique de l'hépatotoxine.

Il est important de caractériser et de grader cette vacuolisation au cours des études de toxicologie pour mettre en évidence un éventuel effet du traitement.

La **nécrose hépatocellulaire focale** est une lésion non spécifique et fréquente chez la souris âgée. L'étiologie de cette nécrose spontanée reste inconnue, surtout lorsqu'elle est observée chez des souris SPF (*Specific Pathogen Free*), mais elle peut être causée par une ischémie, des toxiques, des infections bactériennes ou virales (Ward *et al.*, 1994a). Une embolie bactérienne à partir du tube digestif via le système porte peut aussi être responsable de nécrose hépatocellulaire focale (Harada *et al.*, 1999).

Chez les animaux traités, il convient de faire le diagnostic différentiel avec une nécrose hépatocellulaire multifocale ayant une distribution topographique spécifique (centrolobulaire, midzonale ou périportale), pouvant indiquer dans ce cas une lésion liée au traitement.

L'hépatite chronique active a été décrite récemment pour la première fois chez la souris (Ward *et al.*, 1994b) et a permis la découverte d'une nouvelle bactérie, *Helicobacter hepaticus*, comme agent étiologique. Des investigations ultérieures ont démontré la présence d'hépatites à *Helicobacter hepaticus* chez des souris B6C3F1 issues d'études de cancérogenèse du N.T.P. (*National Toxicology Program*) (Hailey *et al.*, 1998). *Helicobacter hepaticus* colonise le tractus gastro-intestinal puis après migration dans le foie, dans des conditions favorables qui n'ont pas été identifiées, réside préférentiellement dans les canalicules biliaires. Bien que les lésions histologiques soient très suggestives, le diagnostic de certitude repose sur une mise en culture de la bactérie. Une coloration argentique (Warthin-Starry par exemple) peut permettre de mettre en évidence des bactéries spiralées dans les canalicules biliaires. Sur un tissu fixé, il est également possible d'identifier *Helicobacter sp.* par PCR (Riley *et al.*, 1996).

L'angiectasie, aussi appelée péliose hépatique ou télangiectasie, est observée occasionnellement chez la souris âgée, avec une incidence de 0.5% chez la souris B6C3F1 et est parfois associée à une tumeur hépatocellulaire (Harada *et al.*, 1999).

L'angiectasie est considérée comme une lésion intermédiaire entre une dilatation sinusoidale focale et un hémangiome. L'angiectasie se distingue de l'hémangiome par une architecture hépatique préservée et une absence de prolifération de l'endothélium.

2) Vésicule biliaire

◆ Résultats

L'incidence des lésions spontanées observées dans la vésicule biliaire est présentée dans le tableau ci-dessous (**Tableau 8**).

Tableau 8: Incidence des lésions observées dans la vésicule biliaire

<i>Lésion</i>	<i>Mâles</i>				<i>Femelles</i>			
	Incidence Totale (sur 325)	% total	% min.	% max.	Incidence Totale (sur 341)	% total	% min.	% max.
Altération cytoplasmique éosinophilique	135	41.5	32	49	30	8.8	2	28
Calculs biliaires	11	3.4	0	6	1	0,3	0	2
Infiltrat de cellules inflammatoires mixtes	63	19.4	0	41	106	31.1	0	63

Une altération cytoplasmique éosinophile, relativement fréquente, a été observée surtout chez les mâles (44%) par rapport aux femelles (11%). Histologiquement, l'épithélium normal de la vésicule biliaire est cubique à aplati et simple (**Figure 14-A**). On a observé une prolifération focale ou diffuse des cellules épithéliales avec formation de structures glandulaires dans le chorion (**Figure 14-B**). Les cellules épithéliales étaient hypertrophiées avec un cytoplasme homogène fortement éosinophile et des inclusions cristallines. Des cristaux éosinophiles, rectangulaires ou en baguette ont été observés dans le cytoplasme des cellules et/ou dans la lumière des structures glandulaires (**Figure 14-C**).

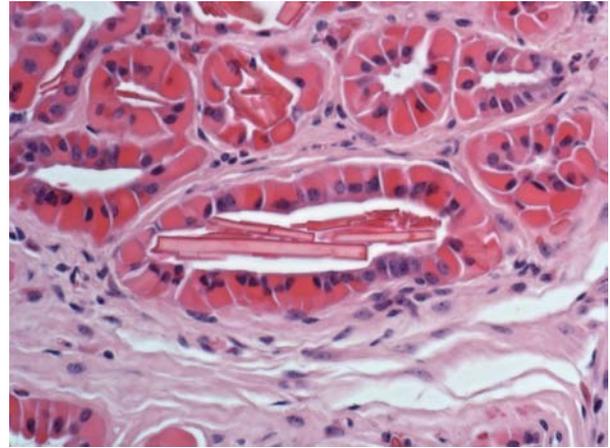
Dans la sous-muqueuse, des infiltrats mixtes de cellules inflammatoires ont été observés chez de nombreux animaux, avec une incidence plus importante chez les femelles.

Des calculs biliaires ont été observés avec une faible incidence et une prédisposition des mâles (4.3%) par rapport aux femelles (0.4%). Histologiquement, les calculs étaient de taille variable, uniques ou multiples le plus souvent, de forme ronde à ovoïde, de couleur éosinophile avec une disposition en couches concentriques (**Figure 14-D**).

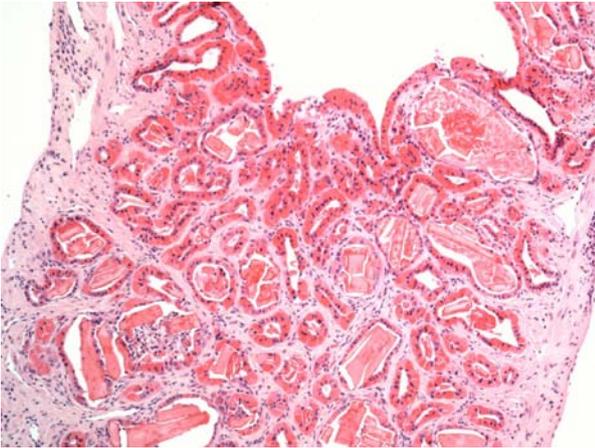
Figure 14 : Lésions observées dans la vésicule biliaire (A à D)



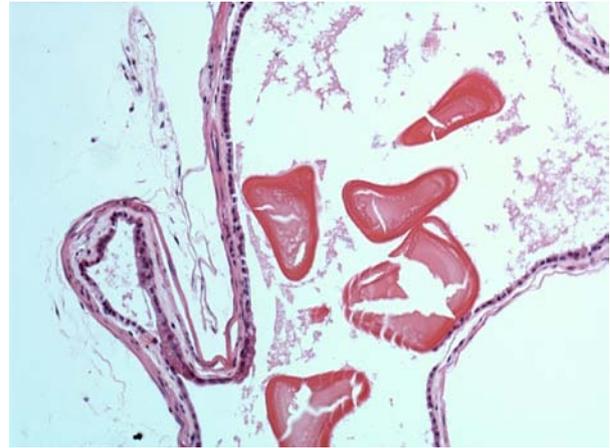
A : épithélium cubique simple de la vésicule biliaire normale (HE, x10)



C : présence de cristaux éosinophiliques dans la lumière des glandes (vésicule biliaire, HE, x20)



B : altération cytoplasmique éosinophile (vésicule biliaire, HE, x10)



D : calculs biliaires (vésicule biliaire, HE, x20)

◆ Discussion

Les lésions d'altération cytoplasmique éosinophile, aussi appelées lésions adénomatoïdes, peuvent être observées dans les canaux biliaires intra- ou extra-hépatiques et dans la vésicule biliaire de la souris âgée (Yoshitomi et Boorman, 1994). Elles sont fréquemment observées chez les souches SWR/J et C58 (Rabstein *et al.*, 1973). La nature des cristaux observés dans les cellules épithéliales ou dans la lumière des glandes pourrait être semblable à celle des cristaux observés dans le poumon lors de pneumonie acidophile (voir §II.D.2). Ces cristaux pourraient être

produits par l'épithélium vésical puisque le cytoplasme éosinophile des cellules et le matériel extracellulaire réagissent de la même façon (Yang et Campbell, 1964).

Les calculs biliaires sont rarement observés de façon spontanée chez la souris de laboratoire (Frith et Ward, 1988). Ils peuvent être induits par un régime alimentaire riche en cholestérol et en acide cholique. La présence de calculs peut entraîner des lésions secondaires : érosion ou ulcération, hyperplasie épithéliale, inflammation ou fibrose de la vésicule biliaire (Lewis, 1984). Dans ce travail, quelques lésions d'hyperplasie épithéliale ont été observées mais sans la présence associée de calculs dans la lumière de la vésicule.

3) Tube digestif

◆ Résultats

Les lésions les plus fréquemment observées dans les différentes parties du tube digestif (estomac, jejunum, iléum, caecum, colon), à savoir l'amyloïdose et l'artérite/périartérite, ont déjà été abordées précédemment (voir § II.A.1). Le **Tableau 9** présente les autres lésions observées dans le tube digestif.

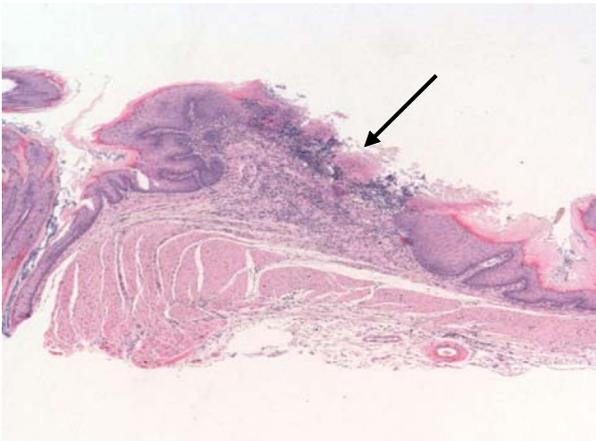
Tableau 9: Incidence des lésions observées dans le tube digestif

<i>Lésion</i>	<i>Mâles</i>				<i>Femelles</i>			
	Incidence totale	% total	% min.	% max.	Incidence totale	% total	% min.	% max.
Estomac								
Erosion: muqueuse non glandulaire	30/344	8.7	4	14	23/347	6,6	2	16
Erosion: muqueuse glandulaire	11/344	3.2	0	6	11/347	3,2	0	8
Hépatocytes ectopiques	0/344	0,0	0	0	1/347	0,3	0	2
Infiltrat de cellules inflammatoires mixtes	75/344	21.8	6	45	90/347	25.9	4	50
Hyperplasie de la muqueuse non glandulaire	87/344	25.3	10	40	89/347	25.6	10	58
Caecum								
Hyperplasie lymphoïde	10/331	3,0	0	6	2/346	0,6	0	2
Rectum								
Prolapsus avec hyperplasie muqueuse	0/340	0,0	0	0	2/349	0,6	0	2

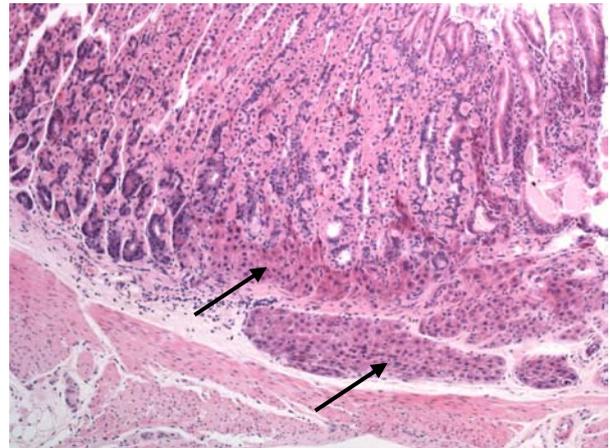
Des lésions d'érosion de la muqueuse ont été observées dans les deux sexes, la muqueuse non glandulaire (pré-estomac) étant plus souvent touchée que la muqueuse glandulaire. Ces lésions ont été associées à des infiltrats mixtes de cellules inflammatoires ainsi qu'à des lésions d'hyperplasie réactive (voir § Lésions pré-tumorales et tumorales) (**Figure 15-A,B**).

Un cas d'ectopie hépatocytaire dans l'estomac glandulaire a été observé chez une femelle. Histologiquement, on a observé une accumulation focale d'hépatocytes bien différenciés dans la sous-muqueuse et dans le chorion de la muqueuse glandulaire (**Figure 15-C,D**). Les glandes gastriques adjacentes étaient dilatées et/ou hyperplasiques.

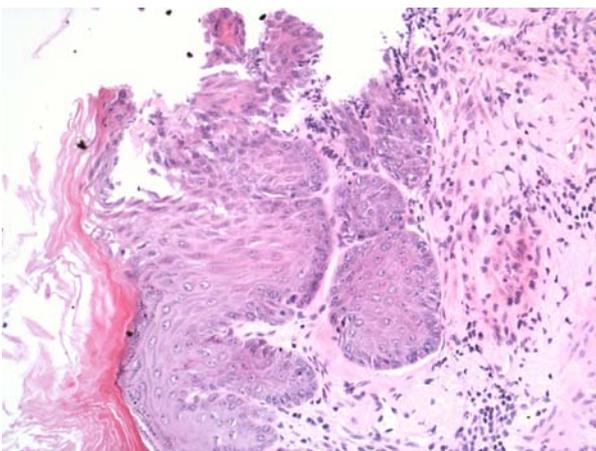
Figure 15 : Lésions observées dans le tube digestif (A à D)



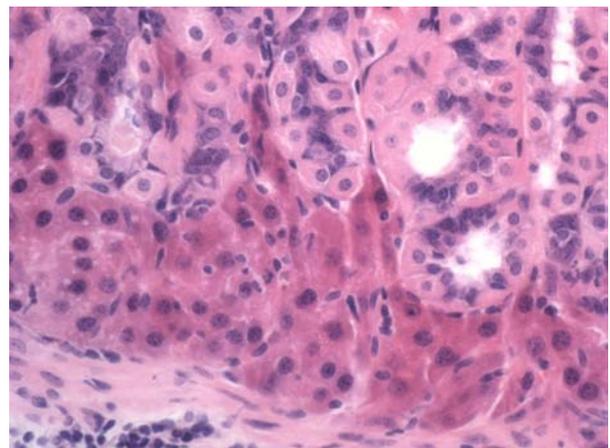
A : érosion (flèche) associée à une hyperplasie de l'épithélium squameux (pré-estomac, HE, x4)



C : ectopie hépatocytaire (estomac, HE, x10)



B : érosion associée à une hyperplasie de l'épithélium squameux (pré-estomac, HE, x20)



D : ectopie hépatocytaire (estomac, HE, x40)

◆ Discussion

Les érosions de la muqueuse de l'estomac, et en particulier celles du pré-estomac, sont très fréquentes chez les souris de laboratoire, en particulier si elles sont traitées par gavage ou inhalation (Leininger *et al.*, 1999). Cependant, dans la plupart des cas, la cause de ces érosions reste inconnue. La revue d'études menées par le NTP dans lesquelles le pré-estomac était un organe cible suggère que les érosions et les ulcères sont secondaires à l'inflammation présente dans les foyers d'hyperplasie et d'hyperkératose de la muqueuse non glandulaire. Les érosions, définies chez le rongeur comme une perte partielle de l'épithélium, sont à distinguer des ulcères dans lesquels la perte de substance s'étend jusqu'à la musculaire-muqueuse, avec un risque de perforation. Dans nos études, nous n'avons pas observé de telles lésions chez les animaux contrôles.

Des cas similaires d'ectopie hépatocytaire ont été décrits dans l'estomac de souris B6C3F1 issues d'études de cancérogenèse (Leininger *et al.*, 1990). Deux hypothèses sont privilégiées quant à l'origine de ces hépatocytes : anomalie congénitale ou différenciation post-natale ectopique (métaplasie). En présence de cette lésion, il faut exclure une invasion ou une métastase de tumeur hépatique bien différenciée. Des cas d'ectopie de tissu pancréatique ont été décrits dans la littérature mais n'ont pas été observés au cours de ces études.

C. Lésions de l'appareil uro-génital

1) Rein

◆ Résultats

L'incidence des lésions observées dans le rein est présentée dans le tableau ci-dessous.

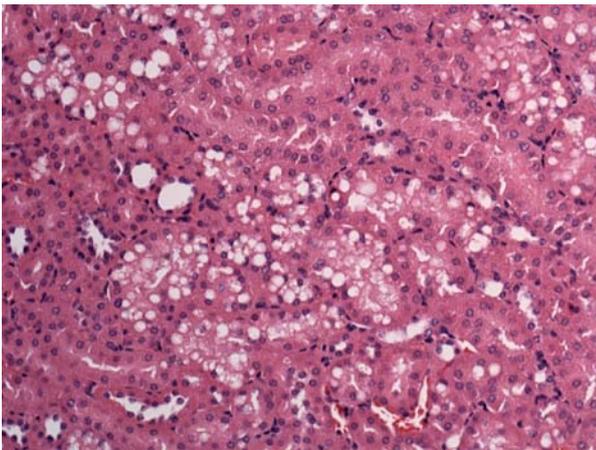
Tableau 10: Incidence des lésions observées dans le rein

<i>Lésion</i>	<i>Mâles</i>				<i>Femelles</i>			
	Incidence totale (/349)	% total	% min.	% max.	Incidence totale (/350)	% total	% min.	% max.
Cylindre(s) hyalin(s)	136	39.0	4	64	232	66.3	36	100
Dilatation du bassinet	9	2,6	0	4	8	2,3	0	6
Fibrose interstitielle	41	11,7	0	24	39	11.1	0	18
Hyperplasie de l'épithélium du bassinnet	4	1.1	0	4	2	0,6	0	4
Infiltrat de cellules mononucléées	206	59.0	34	88	237	67.7	40	86
Nécrose de la papille : unilatérale	2	0,6	0	2	1	0,3	0	2
Nécrose de la papille : bilatérale	1	0,3	0	2	1	0,3	0	2
Minéralisation de la papille	169	48.4	4	84	165	47.1	2	82
Pigments bruns : intra- tubulaires	24	6.9	0	16	23	6.6	0	20
Tubes basophiles	290	83.0	50	88	230	65.7	10	72
Vacuolisation cytoplasmique corticale	323	92,6	86	98	0	0,0	0	0

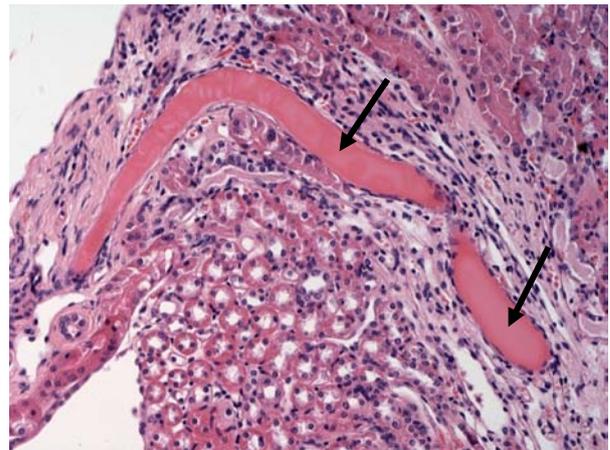
Une vacuolisation de l'épithélium cortical a été observée chez 92 % des mâles uniquement. Il s'agissait d'une micro-vacuolisation des tubes proximaux du cortex externe (**Figure 16-A**).

Les lésions très fréquemment observées dans les deux sexes, souvent associées entre elles, ont été les suivantes : tubes basophiles (caractérisés par un cytoplasme basophile et un noyau vésiculeux), infiltrats de cellules inflammatoires mononucléées, cylindres hyalins (substance intratubulaire éosinophile protéinée) et fibrose interstitielle (**Figure 16-B, C**).

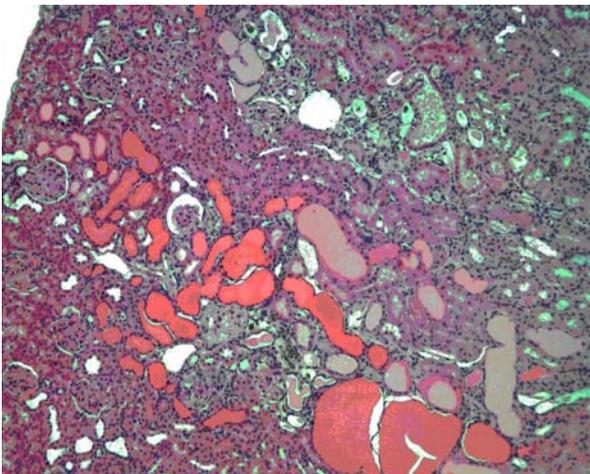
Figure 16 : Lésions observées dans le rein (A à D)



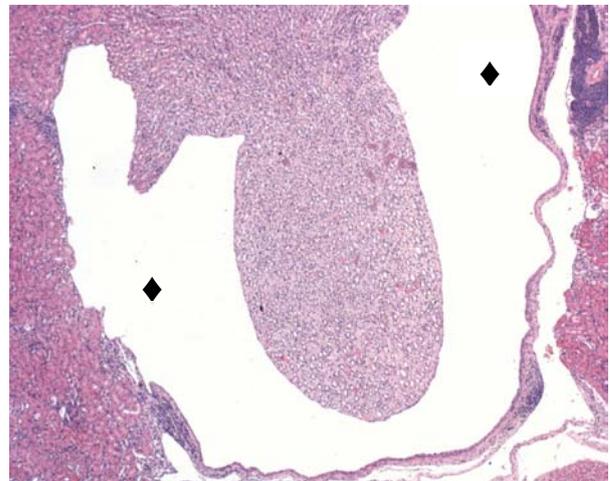
A : vacuolisation physiologique dans le cortex rénal d'une souris mâle (rein, HE, 20)



C : cylindres hyalins dans la médullaire (flèches) (rein, HE, x20)



B : néphropathie chronique (rein, HE, 10)



D : dilatation modérée du bassinnet rénal (losange noir) (rein, HE, x4)

Une hydronéphrose, caractérisée par une dilatation du bassinet urinaire avec atrophie plus ou moins importante de la papille rénale (**Figure 16-D**), a été observée avec la même incidence dans les deux sexes (2.8%). Cette lésion a été unilatérale ou bilatérale et dans les cas très avancés, la papille était complètement atrophiée ainsi qu'une partie du cortex.

Une nécrose de la papille, unilatérale ou bilatérale, a été observée chez les mâles uniquement (3/249 animaux). Chez ces trois animaux, une amyloïdose de grade modéré, touchant à la fois les glomérules et l'interstitium de la papille, a également été observée.

◆ Discussion

La vacuolisation du cortex rénal correspond à une particularité histologique du rein des souris mâles matures sexuellement. Il ne s'agit pas d'une lésion mais il est important de la noter chez les contrôles car ces vacuoles peuvent disparaître chez les animaux traités (observation personnelle).

Une néphropathie chronique, caractérisée par la présence de tubes basophiles, d'infiltrats inflammatoires, de cylindres hyalins et de fibrose interstitielle est bien décrite chez la souris âgée (Seely, 1999). Cette entité est également décrite sous le terme de néphrite interstitielle ou tubulo-interstitielle. Elle correspond chez le rat à la néphropathie progressive chronique. Dans les deux espèces, les mâles sont plus atteints que les femelles. Chez le rat cependant, la lésion qui prédomine en phase terminale est la présence de cylindres protéiques avec une dilatation tubulaire. L'insuffisance rénale qui en résulte ainsi que les lésions secondaires qui en découlent (minéralisations systémiques par exemple) sont souvent une cause de sortie des animaux avant la fin de l'étude. Les lésions ne sont jamais aussi importantes chez la souris. La pathogénie de cette affection reste inconnue chez la souris. Elle peut être aggravée par l'administration de certaines molécules.

Le plus souvent congénitale, l'hydronéphrose peut aussi être secondaire à une obstruction du tractus urinaire ou à une nécrose de la papille associée à une amyloïdose. Une hydronéphrose progressive autosomale récessive avec insuffisance rénale a été rapportée chez la souris C57BL/6 (Horton *et al.*, 1988). Un cas de pseudokyste périrénal secondaire à une hydronéphrose sévère a été récemment décrit chez la souris C57BL/6 (Meyerholz et Hostetter, 2005).

La nécrose de la papille rénale chez la souris âgée est le plus souvent secondaire à une amyloïdose (Frith et Ward, 1988). Ceci semble être le cas dans nos études. Mais elle peut aussi être secondaire à une pyélonéphrite. La nécrose de la papille rénale peut également être induite par une administration chimique, comme c'est le cas avec le 2-bromo éthylamine hydrobromide (Wolf *et*

al., 1992). Dans cette étude, la séquence suivante de lésions a pu être observée : turgescence des cellules endothéliales, œdème interstitiel et vacuolisation des cellules des tubes collecteurs, suivi d'une dégénérescence puis nécrose des cellules endothéliales, interstitielles et tubulaires.

2) Appareil reproducteur mâle

◆ Résultats

L'incidence des lésions observées dans l'appareil génital mâle est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11: Incidence des lésions observées dans l'appareil reproducteur mâle

<i>Lésion</i>	<i>Incidence totale</i>	<i>% total</i>	<i>% min.</i>	<i>% max.</i>
Testicule				
Dégénérescence tubulaire : bilatérale	215/349	61.6	30	78
Dégénérescence tubulaire : unilatérale	85/349	24.4	16	40
Hyperplasie des cellules interstitielles	8/349	2,3	0	6
Epididyme				
Oligospermie : unilatérale	27/350	7.7	2	14
Oligospermie : bilatérale	42/350	12.0	0	50
Granulome(s) spermatique(s)	9/350	2,6	0	6
Prostate				
Hyperplasie glandulaire : focale/multifocale	7/344	2,0	0	4
Vésicules séminales				
Dilatation glandulaire	319/350	91.1	84	100
Hyperplasie glandulaire : focale/multifocale	4/350	1,1	0	6
Glande préputiale				
Abcès	13/350	3,7	0	14

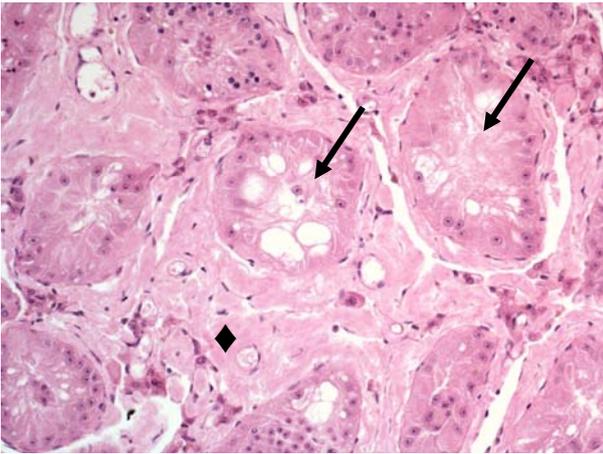
Une dégénérescence tubulaire, le plus souvent bilatérale, a été observée chez près de 70% des mâles. Histologiquement, on a observé une déplétion importante des cellules germinales, avec parfois des tubes contenant uniquement des cellules de Sertoli (**Figure 17-A**). Dans les stades moins sévères, on a observé des cellules germinales nécrotiques et des cellules géantes plurinucléées. En général les lésions étaient diffuses et concernaient tous les tubes séminifères. Dans les cas les plus sévères de dégénérescence testiculaire, une oligospermie unilatérale ou bilatérale a été observée dans l'épididyme chez 14% des mâles (**Figure 17-B**).

La présence de granulome spermatique au sein de l'épididyme a été observée chez 3,6% des mâles. Cette lésion était caractérisée histologiquement par une inflammation focale chronique

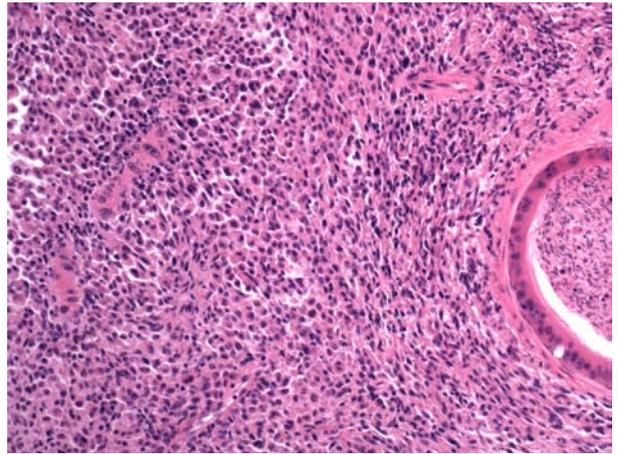
composée par des macrophages épithélioïdes, des cellules géantes à corps étranger, quelques lymphocytes et plasmocytes, et parfois des cristaux de cholestérol (**Figure 17-C, D**).

Un abcès des glandes préputiales a été observé chez 3,6% des mâles. Cette lésion n'a été observée que chez des animaux euthanasiés prématurément, pour lesquels une « masse » en région périnéale avait été détectée et prélevée à l'autopsie. Elle était caractérisée histologiquement par une dilatation de la glande préputiale, dont la lumière était comblée par des granulocytes neutrophiles plus ou moins dégénérés. L'épithélium de la paroi glandulaire était souvent hyperplasique et hyperkératosique. Une inflammation chronique composée par des lymphocytes, des plasmocytes et des macrophages était observée en périphérie de la glande (**Figure 17-E, F**).

Figure 17 : Lésions observées dans l'appareil reproducteur mâle (A à F)



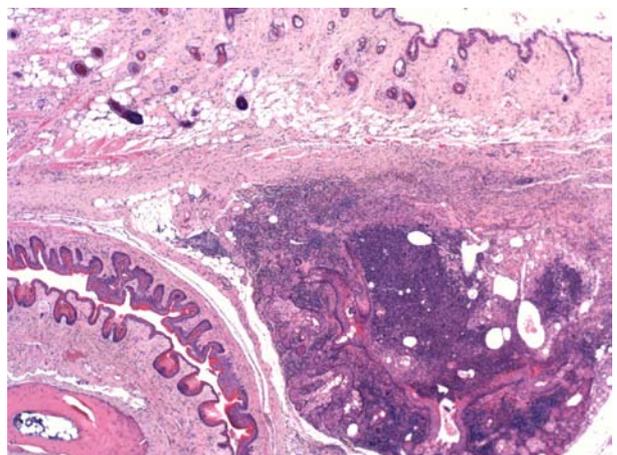
A : dégénérescence tubulaire sévère (flèches) associée à une amyloïdose (losange) (testicule, HE, x20)



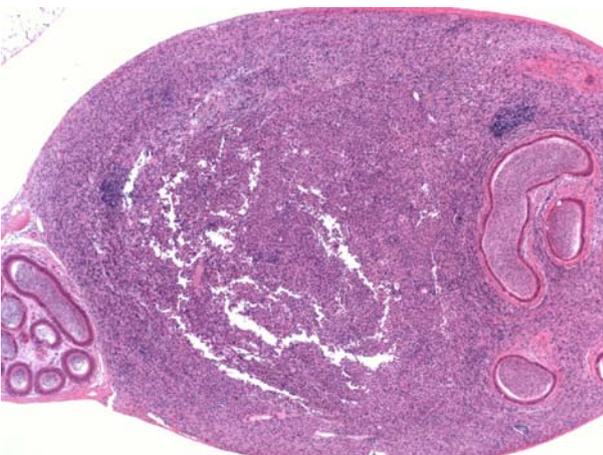
D : granulome spermatique (épididyme, HE, x20)



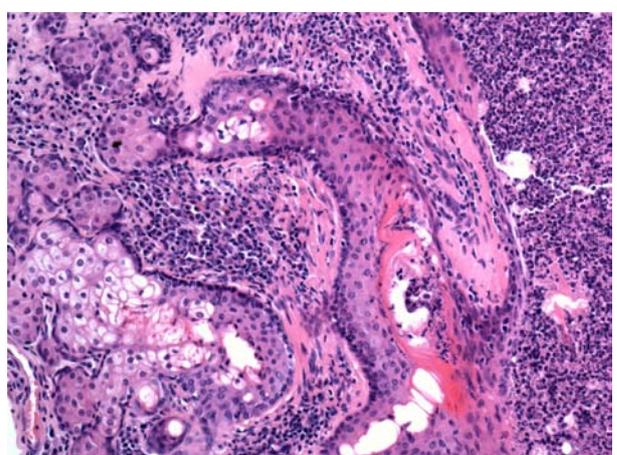
B : oligospermie sévère associée à une dégénérescence testiculaire (épididyme, HE, x4)



E : abcès des glandes préputiales (HE, x4)



C : granulome spermatique (épididyme, HE, x4)



F : abcès des glandes préputiales (HE, x20)

◆ Discussion

Le **granulome spermatique** résulte de la rupture d'un tube rempli de spermatozoïdes qui pénètrent dans l'interstitium et induisent une réaction granulomateuse à corps étranger. Au sein des lésions les plus chroniques, seuls sont présents des macrophages au cytoplasme fusiforme et au noyau vésiculeux; des figures de mitose sont observées. Dans ce cas il convient de faire le diagnostic différentiel avec un sarcome (sarcome histiocytaire, leiomyosarcome). Une recoupe est parfois nécessaire pour rechercher la présence de spermatozoïdes ou de cellules inflammatoires.

Staphylococcus aureus et *Pasteurella pneumotropica* ont été isolées des lésions d'**abcès des glandes préputiales** de souris (Percy et Barthold, 2007). Le combat entre les mâles serait un des facteurs favorisants (Frith et Ward, 1988). Ce n'est pas le cas ici puisque les souris ont été hébergées individuellement.

3) Appareil reproducteur femelle

◆ Résultats

L'incidence des lésions observées dans l'appareil génital femelle est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 12: Incidence des lésions observées dans l'appareil reproducteur femelle

<i>Lésion</i>	<i>Incidence totale</i>	<i>% total</i>	<i>% min.</i>	<i>% max.</i>
Ovaire				
Accumulation de pigments céroïdes	336/348	96.6	94	100
Inactivité/atrophie	326/348	93.7	88	100
Kyste(s) folliculaire(s) hémorragique(s)	130/348	37.4	22	50
Kyste(s)	68/348	19.5	12	30
Utérus				
Hyperplasie endométriale kystique	312/349	89.4	82	94
Vagin				
Atrophie de la muqueuse	17/343	5.0	2	10
Kératinisation	85/343	24,8	0	64
Mucification	29/343	8.5	0	24

Dans l'ovaire, les lésions les plus fréquemment observées ont été une accumulation de pigments céroïdes dans l'interstitium (**Figure 18-A, B**) et une inactivité/atrophie. L'inactivité/atrophie était caractérisée par une diminution du nombre de follicules ovariens, avec une absence de follicules de De Graaf, une diminution du nombre des corps jaunes et une augmentation du tissu interstitiel (**Figure 18-C**).

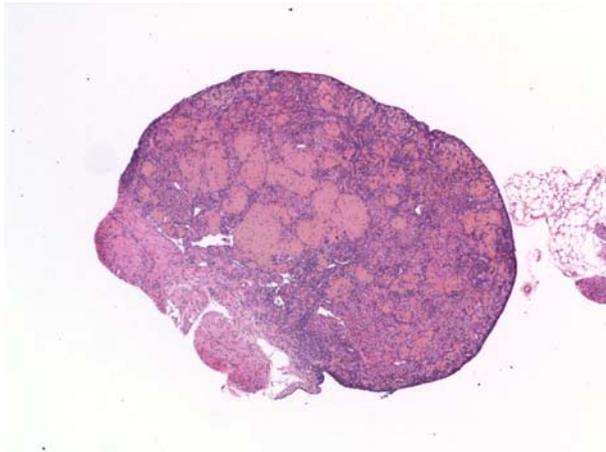
Des kystes ont également été observés : des kystes folliculaires hémorragiques (souvent décrits à l'autopsie) (**Figure 18-D**) et des kystes folliculaires, lutéaux (les plus fréquents), mais aussi épithéliaux et plus rarement para-ovariens.

Dans l'utérus, la lésion la plus fréquente a été une hyperplasie endométriale kystique, observée chez plus de 88% des femelles. A l'histologie, on a observé une augmentation du nombre et de la taille des glandes endométriales (**Figure 18-E**). Les glandes étaient bordées soit par un épithélium cylindrique bas, soit par un épithélium cubique aplati avec dilatation kystique de la

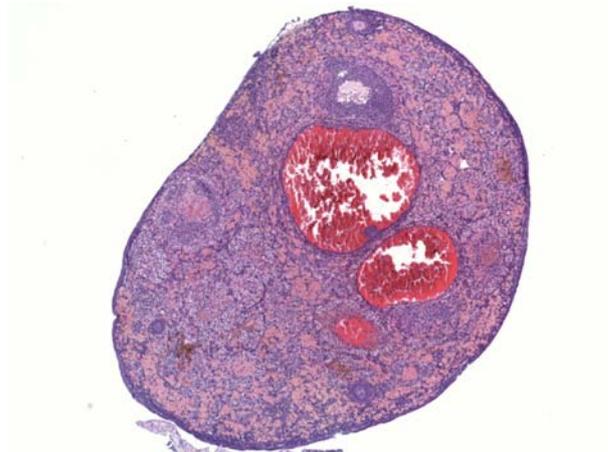
glande (**Figure 18-F**). Les noyaux des cellules épithéliales étaient souvent vésiculeux ou hyperchromatiques et on a pu observer une augmentation de l'activité mitotique. Certaines glandes étaient bordées par un épithélium squameux et remplies de kératine et de cellules épithéliales desquamées. Des cellules inflammatoires (granulocytes neutrophiles, lymphocytes) étaient souvent présentes dans le stroma endométrial.

Dans le vagin, on a observé une kératinisation, une mucification et/ou une atrophie de la muqueuse.

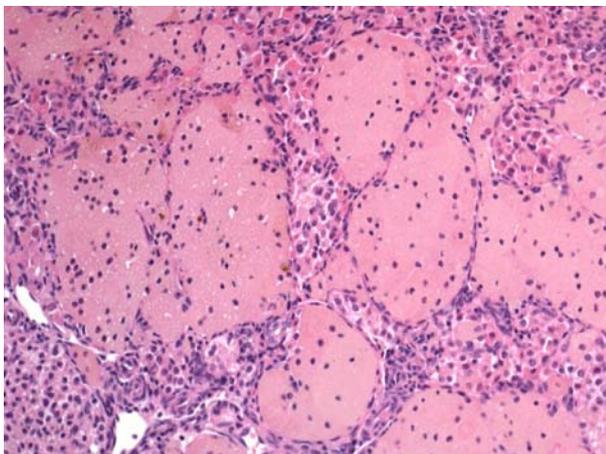
Figure 18 : Lésions observées dans l'appareil reproducteur femelle (A à F)



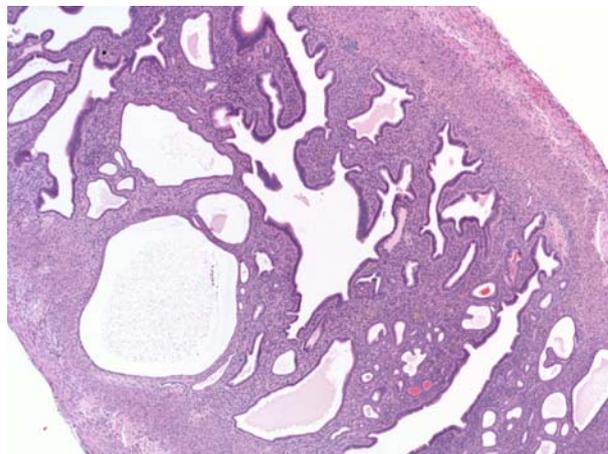
A : accumulation de pigments céroïdes dans l'interstitium ovarien (ovaire, HE, x4)



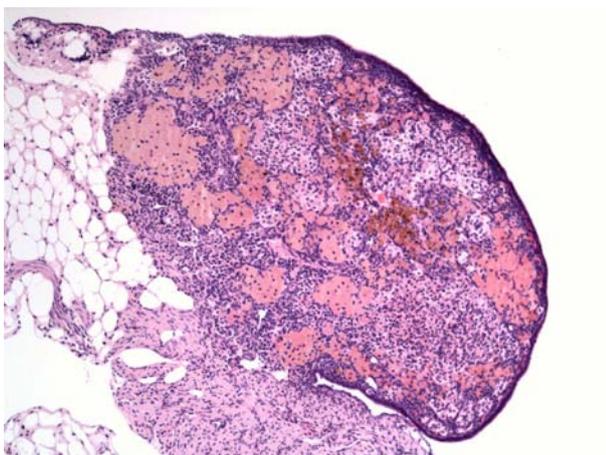
D : kystes hémorragiques (ovaire, HE, x4)



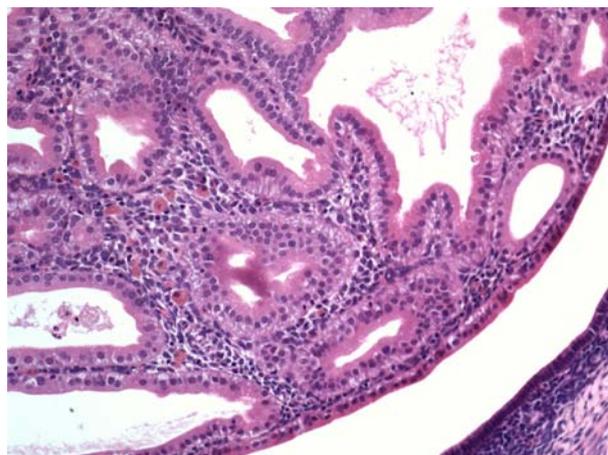
B : accumulation de pigments céroïdes dans l'interstitium ovarien (ovaire, HE, x20)



E : hyperplasie endométriale kystique (utérus, HE, x4)



C : ovaire atrophié et inactif (HE, x4)



F : hyperplasie endométriale kystique (utérus, HE, x20)

◆ Discussion

Les changements « dégénératifs » de l'ovaire sont très fréquents chez la souris âgée (Davis *et al.*, 1999). Au cours des études de cancérogenèse, une atrophie marquée à sévère de l'ovaire est observée chez la plupart des femelles. Ces changements morphologiques sont le reflet d'une perturbation de l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire. Au cours des premiers stades de la sénescence, les sécrétions d'hormones hypophysaires (FSH, LH, prolactine) augmentent et ceci entraîne une persistance des corps jaunes et une augmentation de la taille des follicules. A cause du dérèglement hormonal, aucune ovulation ne se produit : en conséquence, on observe une augmentation des follicules kystiques et dégénérés. L'augmentation de la dégénérescence des follicules entraîne une augmentation du tissu interstitiel et un dépôt de pigments céroïdes. Associés à ces changements ovariens, une atrophie de la muqueuse du vagin est souvent observée.

L'hyperplasie endométriale kystique est la lésion la plus fréquemment observée dans l'utérus de la souris B6C3F1 au cours des études de cancérogenèse (Davis *et al.*, 1999). Il semblerait que cette lésion ne soit pas pré-néoplasique puisque l'incidence des tumeurs utérines est très faible chez la B6C3F1, comme chez les autres souches de souris. L'hypothèse selon laquelle cette lésion serait secondaire à une stimulation œstrogénique persistante n'est pas vérifiée.

D. Lésions du système cardio-respiratoire

L'incidence des lésions observées dans le système cardio-respiratoire est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 13: Incidence des lésions observées dans le système cardio-respiratoire

<i>Lésion</i>	<i>Mâles</i>				<i>Femelles</i>			
	Incidence totale	% total	% min.	% max.	Incidence totale	% total	% min.	% max.
Cœur								
Cardiomyopathie	49/350	14,0	0	24	27/350	7.7	0	18
Minéralisation des muscles papillaires	49/350	14.0	0	32	33/350	9.4	0	22
Thrombose atriale	7/350	2,0	0	8	1/350	0,3	0	2
Poumon								
Inflammation périvasculaire	63/349	18.1	2	30	120/349	34.4	22	58
Inflammation avec cristaux éosinophiliques	8/349	2.3	0	6	18/349	5,2	4	8
Macrophages alvéolaires	17/349	4,9	2	10	21/349	6.0	0	12

1) Cœur

◆ Résultats

Une cardiomyopathie dégénérative a été observée chez 14.4% des mâles et 8.8% des femelles. A l'histologie, on a observé un ensemble de lésions dégénératives et inflammatoires au sein du myocarde : dégénérescence et/ou nécrose des fibres myocardiques, infiltration par des cellules inflammatoires (granulocytes pour les lésions aiguës et lymphocytes, macrophages pour les lésions plus chroniques), fibroblastes et fibrose (**Figure 19-A, B**). Les lésions étaient localisées le plus souvent dans le ventricule gauche, le septum inter-ventriculaire et l'apex. Dans les lésions les plus avancées, le ventricule gauche était remplacé par un sac fibreux.

Une thrombose atriale, en général unilatérale, a été observée chez 2.8% des mâles et 0.4% des femelles. La lésion, presque toujours localisée dans l'atrium gauche, était caractérisée par la présence dans la cavité atriale d'une substance éosinophile amorphe disposée en couches lamellaires (fibrine) associée à des débris cellulaires et des granulocytes neutrophiles en périphérie (lésion aiguë) (**Figure 19-C**). Dans les lésions chroniques, le thrombus était organisé avec du tissu fibreux, et des foyers de métaplasie cartilagineuse ou osseuse ont pu être observés.

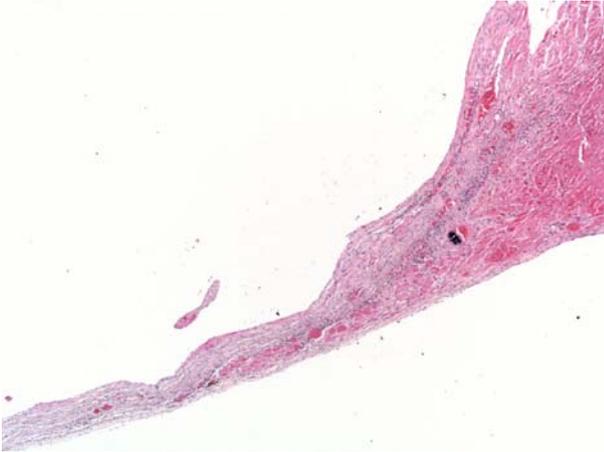
◆ Discussion

La cardiomyopathie est une lésion bien décrite chez plusieurs souches de souris, dont la C57BL/6 (Elwell et Mahler, 1999). Le terme est employé pour décrire un spectre de lésions cardiaques spontanées, progressives et dégénératives liées à l'âge. L'incidence réelle de cette lésion est difficile à apprécier à cause des différentes terminologies utilisées par les pathologistes dans les études de cancérogenèse (fibrose, inflammation chronique, dégénérescence myocardique, cardiopathie, cardiomyopathie...) ainsi que du seuil de détection variable selon les pathologistes pour poser le diagnostic (Ward *et al.*, 1979). La cardiomyopathie dégénérative est à distinguer des altérations histologiques et ultrastructurales du myocarde observées dans certaines dystrophies musculaires héréditaires spécifiques de certaines souches (Price et Papadimitriou, 1996).

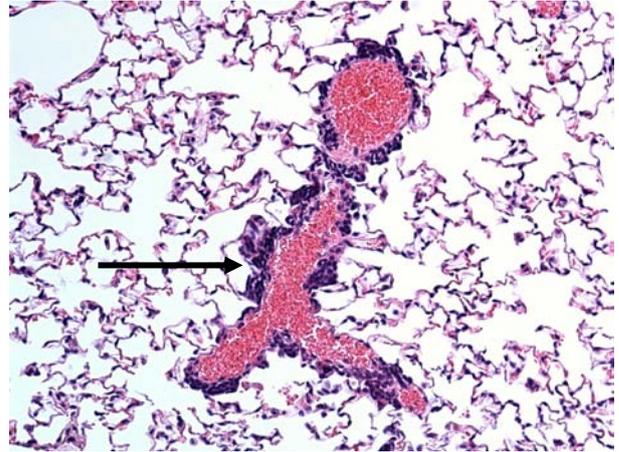
La thrombose atriale est une lésion assez fréquente chez différentes souches de souris et représente une cause majeure de mortalité (Maita *et al.*, 1988). Au cours de nos études, elle a représenté une cause de mort chez 5% des mâles et 2% des femelles (voir § I.A.2)).

Plusieurs facteurs semblent être impliqués dans le développement de cette lésion comme la souche, le sexe, l'âge, le régime alimentaire et la reproduction : la thrombose atriale est une lésion de la souris âgée dans certaines souches et elle est plus fréquente chez la femelle BALB/c multipare (Carlton et Engelhardt, 1991). Les facteurs alimentaires qui peuvent augmenter l'incidence de thrombose atriale sont un déficit en cuivre (Klevay, 1985) et un régime riche en lipides (Ball *et al.*, 1965). Les lésions cardiaques fréquemment associées à une thrombose atriale sont : une cardiomyopathie dégénérative, une inflammation endocardique, une minéralisation, une amyloïdose et une dégénérescence myxoïde des valvules (Yoshizawa *et al.*, 2005). Toutefois, le lien entre la cardiomyopathie et la thrombose atriale n'est pas clairement établi. D'ailleurs, au cours de nos études de cancérogenèse, les deux lésions n'ont pas forcément été associées (observation personnelle).

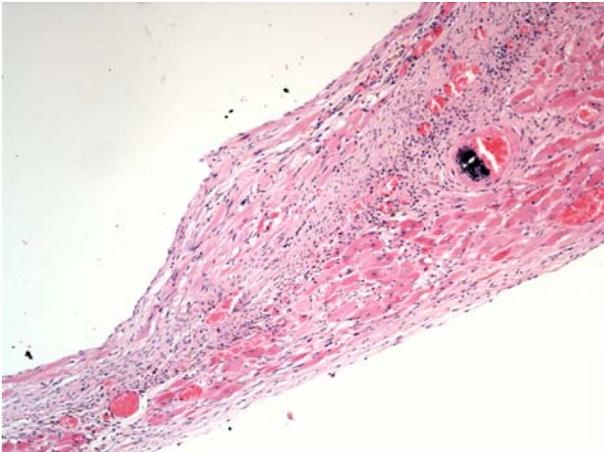
Figure 19 : Lésions observées dans le système cardio-respiratoire (A à F)



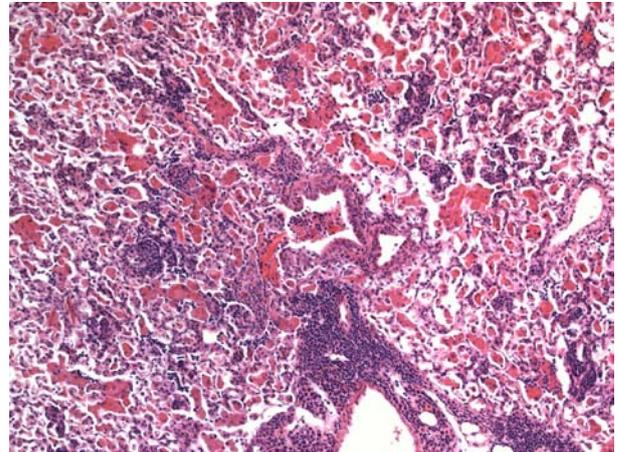
A : atrophie sévère du myocarde suite à une cardiomyopathie (cœur, HE, x4)



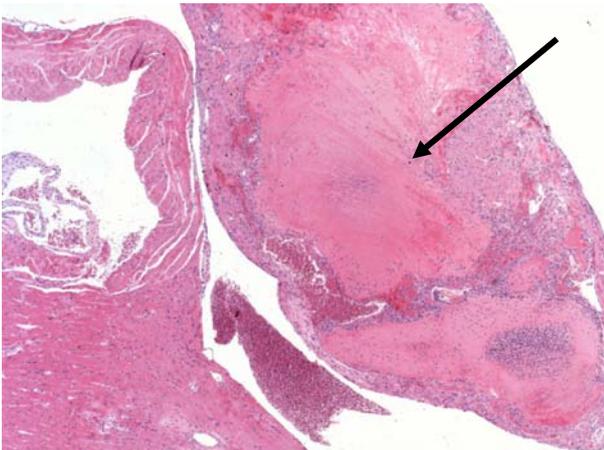
D : infiltrat périvasculaire à cellules mononucléées (flèche) (poumon, HE, x20)



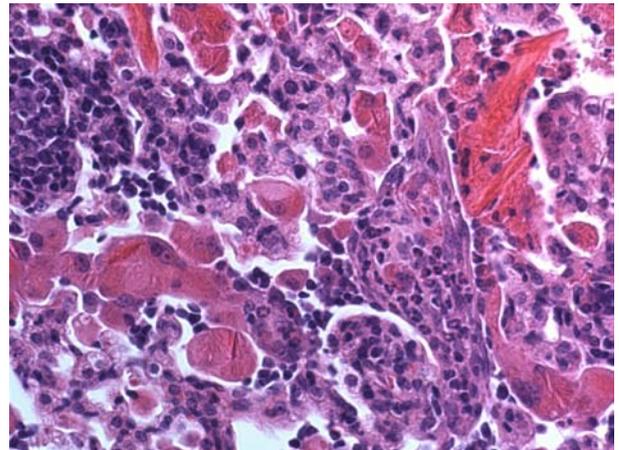
B : fibrose du myocarde suite à une cardiomyopathie (cœur, HE, x10)



E : inflammation à cristaux éosinophiles (poumon, HE, x10)



C : thrombose de l'atrium gauche (flèche) (cœur, HE, x4)



F : inflammation à cristaux éosinophiles (poumon, HE, x20)

2) Poumons

◆ Résultats

Les trois lésions les plus fréquemment rencontrées au cours des études de cancérogenèse chez la souris C57BL/6 ont été : une inflammation périvasculaire (22,3% à 36,5%), une histiocytose alvéolaire (4,8% à 7,6%) et une inflammation à cristaux éosinophiles (3,2% à 5,2%). D'une manière générale, les femelles ont été plus touchées que les mâles.

L'inflammation périvasculaire était caractérisée histologiquement par une accumulation de cellules mononucléées (lymphocytes surtout, quelques plasmocytes) autour des vaisseaux de moyen et petit calibre (**Figure 19-D**). Parfois l'infiltrat était mixte avec la présence de granulocytes éosinophiles. La lésion a été observée avec une sévérité minimale à modérée. Cette lésion était souvent associée à une histiocytose alvéolaire, caractérisée par l'accumulation de macrophages au cytoplasme spumeux dans les alvéoles.

L'inflammation à cristaux éosinophiles était caractérisée par des infiltrats multifocaux à coalescents de macrophages au cytoplasme éosinophile abondant, de cellules géantes plurinucléées, de granulocytes éosinophiles et neutrophiles, de lymphocytes et de plasmocytes dans les espaces alvéolaires et dans les bronchioles (**Figure 19-E**). Des cristaux réfringents, fortement éosinophiles, de forme allongée en aiguille ou de forme rectangulaire, ont été observés soit libres dans les alvéoles et les voies aériennes, soit dans le cytoplasme des macrophages et des cellules géantes (**Figure 19-F**). Une inflammation lympho-plasmocytaire périvasculaire était souvent associée. Cette inflammation à cristaux a été observée soit de façon isolée, soit en périphérie d'une lésion pulmonaire tumorale primitive (adénome ou adénocarcinome bronchiolo-alvéolaire).

◆ Discussion

L'étiologie de ces lésions pulmonaires fréquentes mais de faible intensité et sans expression clinique reste inconnue.

L'inflammation à cristaux éosinophiliques, aussi appelée pneumonie éosinophilique cristalline, est bien décrite chez la souris et plus particulièrement chez les souris de souche C57BL/6 (Murray et Luz, 1990). Elle est souvent observée en association avec une autre pathologie pulmonaire, tumorale, infectieuse ou une hypersensibilité (Hoenerhoff *et al.*, 2006). On a d'abord supposé que les cristaux étaient semblables aux cristaux de Charcot-Leyden observés chez l'homme au cours de pathologies pulmonaires riches en éosinophiles (helminthose, asthme). Mais la caractérisation biochimique des cristaux a démontré la présence de la protéine YM1 (Guo *et al.*,

2000), appartenant à la famille des chitinases et dont la fonction n'est pas clairement élucidée. La protéine YM1 jouerait un rôle dans les interactions cellule/cellule et cellule/matrice extra-cellulaire, dans les défenses immunitaires de l'hôte et aussi dans l'hématopoïèse. Le mécanisme d'induction de la pneumonie éosinophilique cristalline avec formation de cristaux YM1-positifs chez la souris reste inconnu.

E. Lésions des glandes endocrines

L'incidence des lésions observées dans les glandes endocrines est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 14 : Incidence des lésions observées dans les glandes endocrines

<i>Lésion</i>	<i>Mâles</i>				<i>Femelles</i>			
	Incidence totale	% total	% min.	% max.	Incidence totale	% total	% min.	% max.
Glande surrénale								
Atrophie corticale	321/344	93.3	84	98	4/348	1,1	0	4
Dégénérescence céroïde	324/344	94.2	88	98	315/348	90.5	77	100
Nodule extra-cortical	15/344	4,4	0	10	30/348	8.6	0	26
Glande thyroïde								
Thymus ectopique	1/345	0,3	0	2	4/346	1,2	0	4
Glande parathyroïde								
Kyste(s)	8/296	2.7	0	8	8/305	2.6	0	7
Hypophyse								
Kyste(s) de la Pars intermedia	2/334	0,6	0	2	6/343	1.7	0	4
Kyste(s) de la Pars distalis	100/334	29.9	19	38	36/343	10.5	2	19

1) Glandes surrénales

◆ Résultats

Une dégénérescence céroïde a été observée chez plus de 93% des animaux dans les deux sexes. Histologiquement, la lésion était caractérisée par une accumulation de pigments jaunâtres à bruns dans le cytoplasme des cellules corticales situées à la jonction cortico-médullaire. Le cytoplasme des cellules était souvent vacuolisé, leur noyau pycnotique et des cellules multinucléées ont souvent été observées (**Figure 20-A**).

Une atrophie du cortex surrénalien a été observée chez la majorité des mâles. Histologiquement, on a observé une diminution de la hauteur du cortex (zone fasciculée surtout)

(**Figure 20-B**). Dans la plupart des cas, cette atrophie était hétérogène avec une apparence irrégulière du cortex.

Des nodules surrenaliens accessoires ont été observés assez fréquemment et plutôt chez les femelles (11.2% contre 4.9% chez les mâles). Histologiquement, on a observé des nodules sphériques de cortex surrenalien, simples ou multiples, localisés à un pôle de la glande surrenale, soit enchâssés dans le cortex (sous-capsulaires), soit en dehors de la capsule, dans le tissu adipeux adjacent (**Figure 20-C**). Des lésions dégénératives du cortex surrenalien ont été observées également dans le nodule accessoire (amyloïdose, dégénérescence céroïde).

◆ Discussion

La dégénérescence céroïde est une lésion de la souris âgée très fréquemment observée dans de nombreuses souches (Nyska et Maronpot, 1999). Le pigment « céroïde » est caractérisé par une auto-fluorescence et les colorations spéciales comme le PAS, le Zhiel et le noir Soudan sont positives alors que la coloration de Perls est négative. En microscopie électronique, on observe des granules pigmentés entourés par des membranes, vacuolisés et homogènes, de taille variable. Dans certains granules on a observé des figures de myéline. Plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'origine de ces pigments : mitochondries dégénérées et/ou lysosomes s'accumulant à la suite d'un dysfonctionnement endocrinien ou d'une perturbation du métabolisme des lipides.

Les nodules surrenaliens accessoires sont des lésions congénitales assez fréquemment rapportées chez plusieurs souches de souris, avec une prédisposition plus importante chez les femelles (Nyska et Maronpot, 1999). Les nodules de grande taille ne doivent pas être confondus avec des tumeurs du cortex surrenalien.

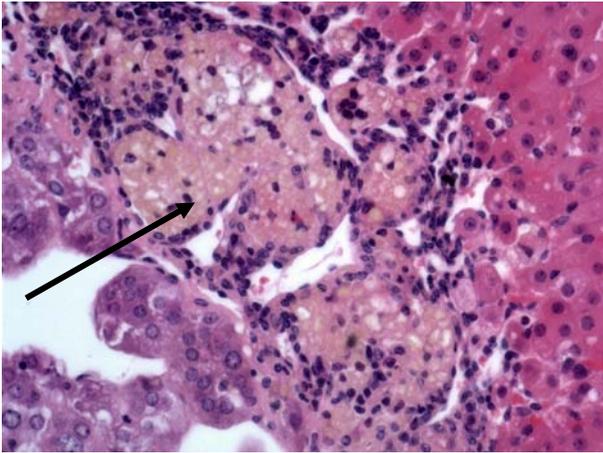
2) Glandes thyroïdes et parathyroïdes

◆ Résultats

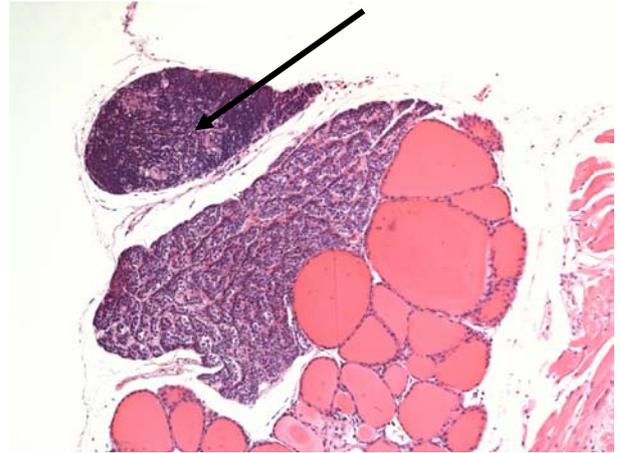
L'ectopie de thymus dans la glande thyroïde a été observée avec une faible incidence (1.2%), chez les mâles uniquement. Les îlots de tissu thymique ont été facilement reconnaissables : amas de tissu lymphoïde avec distinction des deux régions corticales et médullaires, plus ou moins involuées (**Figure 20-D**).

Dans la glande parathyroïde, l'incidence des kystes a été faible et comparable dans les deux sexes (environ 3%). Histologiquement, on a observé des kystes simples ou multiloculés et bordés par un épithélium cylindrique cilié (**Figure 20-E**).

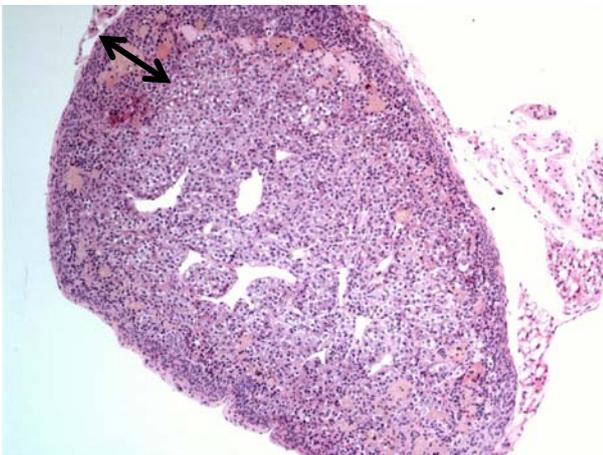
Figure 20 : Lésions observées dans les glandes endocrines (A à F)



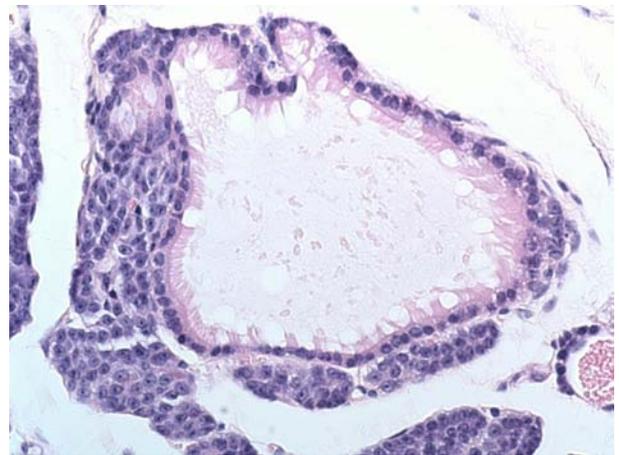
A : dégénérescence céroïde à la jonction cortico-médullaire (flèche) (glande surrénale, HE, x40)



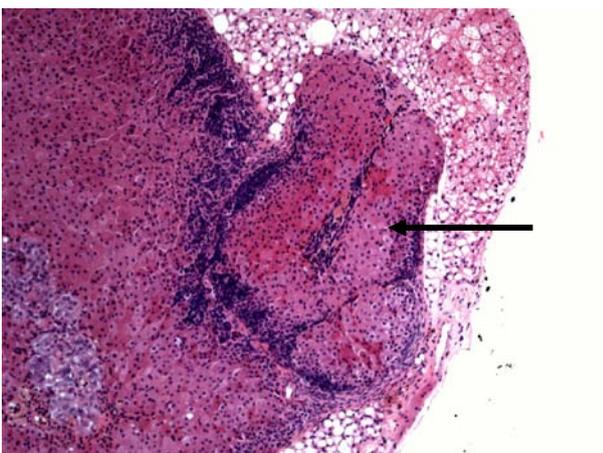
D : ectopie de tissu thymique (flèche) à la périphérie d'une glande thyroïde (HE, x10)



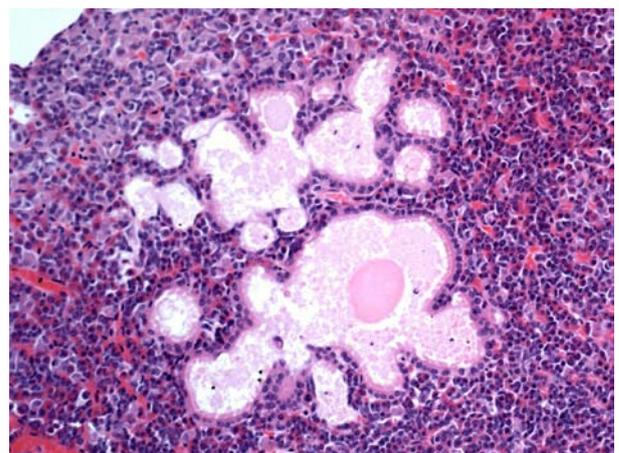
B : atrophie sévère du cortex chez une souris mâle (flèche) (glande surrénale, HE, x10)



E : kyste congénital à cellules ciliées (glande parathyroïde, HE, x40)



C : nodule surrénalien accessoire (flèche) (glande surrénale, HE, x10)



F : kyste congénital à cellules ciliées dans la pars distalis (hypophyse, HE, x20)

◆ Discussion

L'ectopie tissulaire résulte de la persistance de cellules embryonnaires dans un site anatomique aberrant au cours du développement embryonnaire. La présence de tissu thymique au sein de la glande thyroïde s'explique par le fait que les deux tissus sont issus de la même poche pharyngée.

Les kystes observés dans la glande parathyroïde sont d'origine congénitale et résultent de la persistance et de la dilatation du canal qui connecte les ébauches de la parathyroïde et du thymus au cours du développement embryonnaire.

3) Hypophyse

◆ Résultats

Dans l'hypophyse, deux types de kystes ont été observés au sein de la pars distalis. L'incidence a été deux fois plus importante chez les mâles que chez les femelles (29,9% versus 12,7%). Il s'agissait soit de kystes vrais bordés par un épithélium cubique à cylindrique cilié, remplis par une substance protéinacée éosinophile (**Figure 20-F**); soit de pseudo-kystes sans paroi véritable.

Des kystes similaires ont été observés dans la pars intermedia.

◆ Discussion

Dans le premier cas, les kystes correspondent à des vestiges de la poche de Rathke et sont des lésions congénitales. Dans le deuxième cas, les pseudo-kystes résultent d'une dégénérescence focale de la pars distalis avec perte de cellules, et correspondent donc à une lésion spontanée dégénérative. L'incidence des kystes de la pars distalis a été rapportée entre 10 et 20% chez la souris de souche non spécifiée (Watanabe, 1991).

F. Lésions du système hématolymphopoïétique

L'incidence des lésions observées dans le système hématolymphopoïétique est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 15 : Incidence des lésions observées dans les organes hématolymphopoïétiques

<i>Lésion</i>	<i>Mâles</i>				<i>Femelles</i>			
	Incidence totale	% total	% min.	% max.	Incidence totale	% total	% min.	% max.
Rate								
Hémosidérose	154/343	44.9	16	80	329/349	94.3	82	98
Erythropoïèse extra-médullaire	141/343	41.1	13	86	309/349	88.5	76	98
Pigments mélaniques	33/343	9.6	0	17	11/349	3.2	0	12
Hyperplasie lymphoïde	18/343	5.2	0	14	42/349	12.0	4	24
Hyperplasie myéloïde	14/343	4,1	0	6	35/349	10.0	0	28
Thymus								
Atrophie/involution	315/325	96.9	89	100	320/341	93.8	84	98
Kyste(s)	60/325	18.5	4	30	56/341	16.4	2	30
Glande parathyroïde ectopique	40/325	12.3	0	33	38/341	11.1	0	22
Nœud lymphatique mésentérique								
Hyperplasie lymphoïde	42/330	12,7	5	20	37/342	10.8	2	33
Plasmocytose	24/330	7.3	0	39	25/342	7.3	0	31
Hémosidérose	6/330	1.8	0	12	20/342	5.8	0	43
Moelle osseuse hématopoïétique (sternum)								
Hyperplasie myéloïde	32/347	9,2	0	18	46/349	13.2	0	18
Hyperplasie érythroïde	10/347	2.9	0	6	6/349	1,7	0	4
Hyperplasie lymphoïde	1/347	0,3	0	2	5/349	1.4	0	8

1) Hématopoïèse extra-médullaire

◆ Résultats

Une hématopoïèse extra-médullaire a été observée et évaluée principalement dans le foie et la rate.

Dans le foie, une érythropoïèse extra-médullaire a été observée chez 2.8% des mâles et 7.6% des femelles. Histologiquement, on a observé des foyers d'érythroblastes dans les capillaires sinusoides (**Figure 21-A**).

Dans la rate, une augmentation de l'érythropoïèse extra-médullaire a été observée chez 28% des mâles et 86% des femelles. Une hyperplasie myéloïde a été observée chez 4.5% des mâles et 11% des femelles. Histologiquement, on a observé un comblement de la substance rouge par des érythroblastes (**Figure 21-B, C**) ou par des précurseurs de la lignée granulocytaire (myélocytes, métamyélocytes) (**Figure 21-D, E**). Lors des lésions les plus sévères, on a observé une atrophie secondaire de la pulpe blanche.

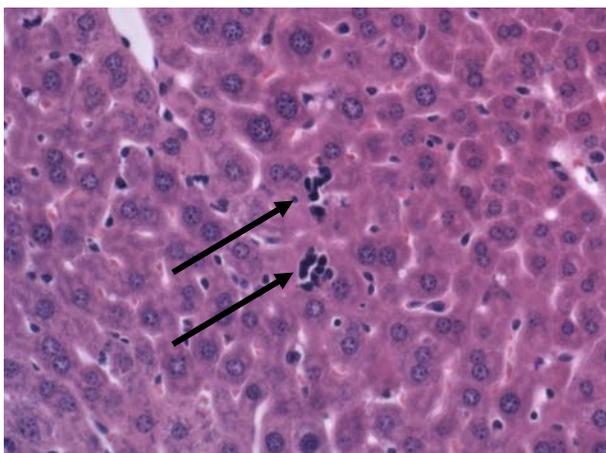
◆ Discussion

Dans le foie, une hématopoïèse extra-médullaire est présente chez la souris pendant les périodes fœtales et néonatales, puis la moelle osseuse et la rate prennent le relais chez l'adulte (Harada *et al.*, 1996). Dans le foie adulte, on peut observer une hématopoïèse secondaire à une infection et/ou une inflammation, une tumeur ou une anémie. Au cours des études de cancérogenèse, la lignée érythroïde est la plus fréquemment observée. L'incidence de l'érythropoïèse extra-médullaire est en général plus élevée chez la femelle.

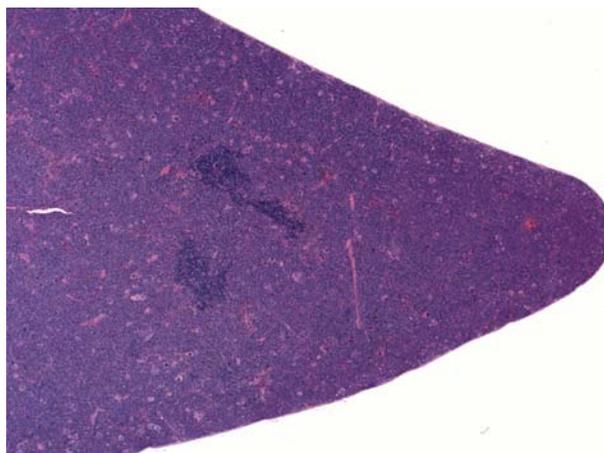
Dans la rate, on observe une hématopoïèse extra-médullaire physiologique chez la souris (Ward *et al.*, 1999). Elle n'est rapportée dans les tables d'incidence que lorsque le seuil physiologique est dépassé et ceci dépend de l'appréciation de chaque pathologiste. Il ne s'agit donc pas d'une lésion en tant que telle lorsque la sévérité observée est faible (grade minimal).

Une érythropoïèse extra-médullaire est en général observée en cas d'anémie. Une hyperplasie myéloïde est observée lors d'une inflammation chronique ou d'un processus tumoral. Au cours de nos études, on a noté une association fréquente de l'hyperplasie myéloïde avec les lésions de dermatite ulcéreuse ou d'abcès des glandes préputiales.

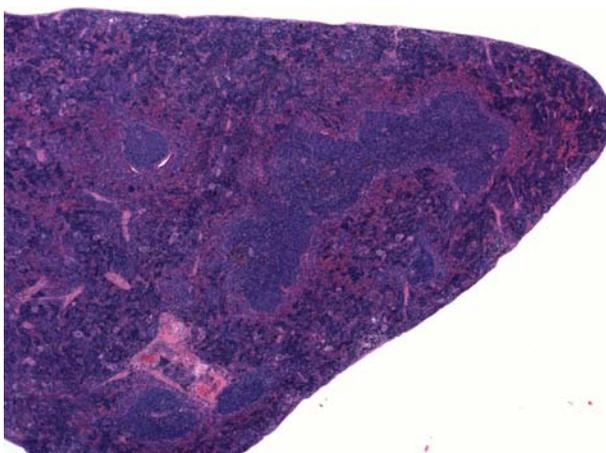
Figure 21 : Lésions observées dans les organes hématolymphopoiétiques (A à F)



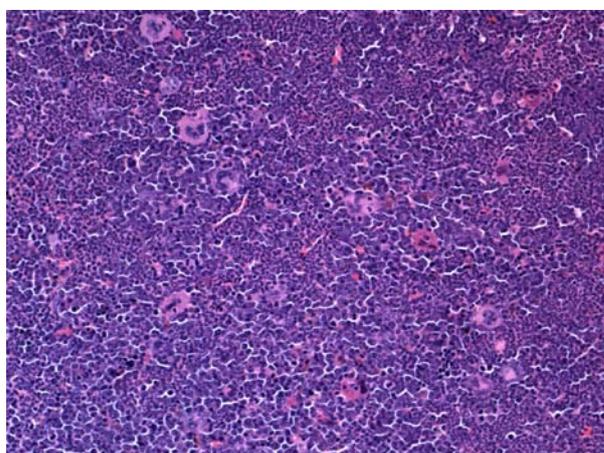
A : érythropoïèse extra-médullaire (flèches) (foie, HE, x40)



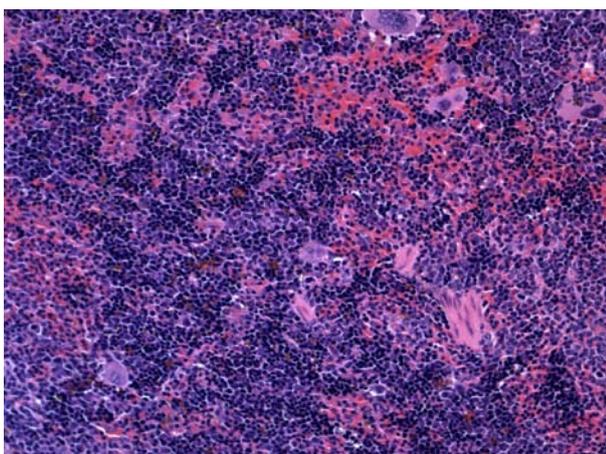
D : myélopoïèse extra-médullaire (rate, HE, x4)



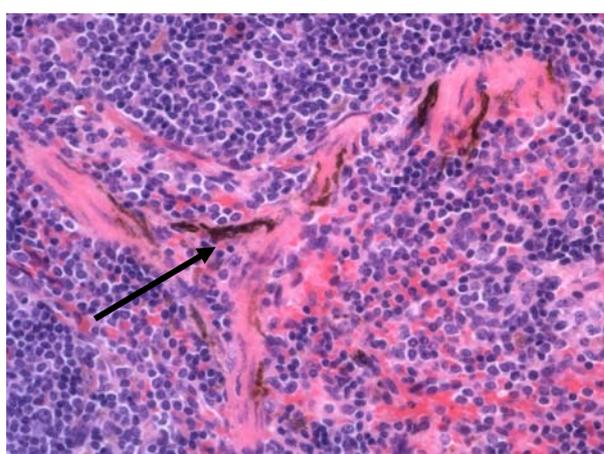
B : érythropoïèse extra-médullaire (rate, HE, x4)



E : myélopoïèse extra-médullaire (rate, HE, x20)



C : érythropoïèse extra-médullaire (rate, HE, x20)



F : mélanose (flèche) (rate, HE, x20)

2) Lésions de la rate

◆ Résultats

Deux types de pigments ont été observés au sein du parenchyme :

- de l'hémosidérine : on a observé un pigment brun dans les macrophages, au sein de la pulpe rouge. L'incidence a été beaucoup plus importante chez les femelles que chez les mâles (respectivement 96.4% et 34.4%).
- de la mélanine : on a observé un dépôt de pigment brun-noir dans des cellules conjonctives allongées (mélanocytes), essentiellement dans la capsule et les trabécules (**Figure 21-F**), avec une incidence plus importante chez les mâles que chez les femelles. En général, l'observation de tâches noires sur la capsule avait été notée en autopsie.

◆ Discussion

L'hémosidérine est un pigment issu de la dégradation des érythrocytes, riche en fer. La présence de ce pigment au sein de la pulpe rouge splénique en faible quantité est physiologique. Le dépôt de ce pigment peut augmenter en cas d'anémie hémolytique et c'est pourquoi il est important de grader son intensité au cours des études de toxicologie.

Dans les données historiques du NTP, l'incidence est plus importante chez les femelles B6C3F1 que chez les mâles (Ward *et al.*, 1999), comme c'est le cas dans nos études.

La présence de mélanocytes dans la capsule et les trabécules de la rate est décrite sous le nom de mélanose. La mélanose splénique est caractéristique des souris à pelage noir et elle a été décrite dans de nombreuses souches (The Jackson Laboratory, 1989). Une coloration spéciale (Perls par exemple) peut permettre de faire la différence avec un dépôt d'hémosidérine (qui serait Perls positif).

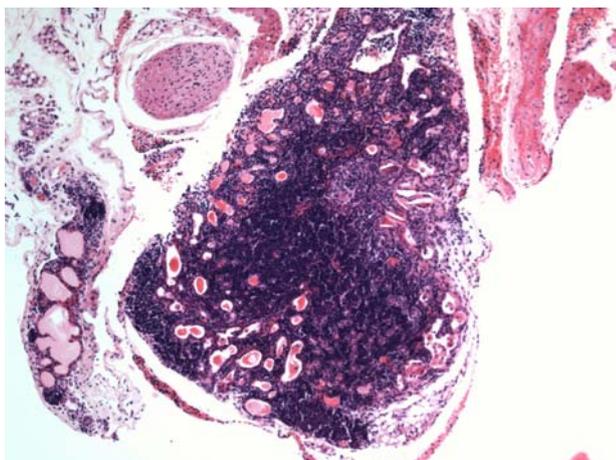
3) Lésions du thymus

◆ Résultats

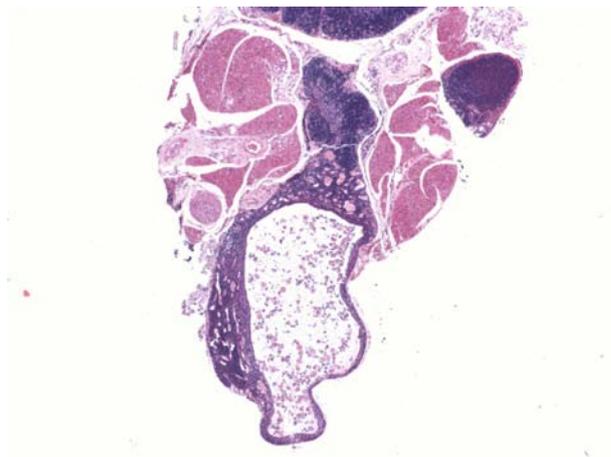
Une atrophie/involution du thymus a été observée chez la quasi-totalité des animaux. Histologiquement, on a observé une diminution du ratio épaisseur du cortex/épaisseur de la médullaire. Le cortex avait une apparence de « ciel étoilé », avec la présence de corps apoptotiques dans les macrophages. Dans les atrophies sévères, on a observé une déplétion lymphocytaire avec des cordons épithéliaux bien visibles (**Figure 22-A, B, C**).

Des kystes ont été observés chez environ 20% des animaux. Histologiquement, ces kystes étaient bordés par un épithélium cubique souvent cilié et contenaient parfois une substance éosinophile dans la lumière (**Figure 22-D**).

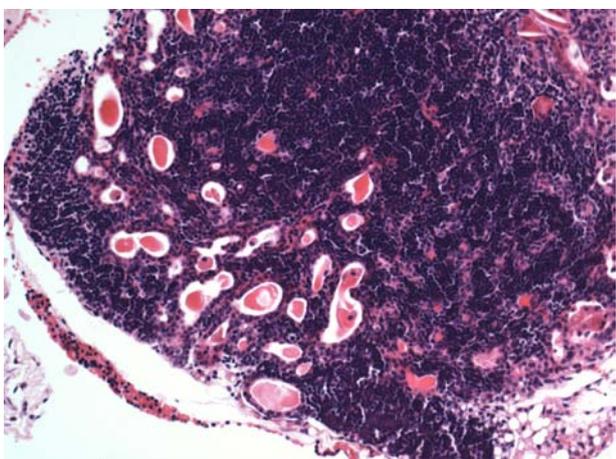
Figure 22 : Lésions observées dans les organes hématolymphoïétiques (suite) (A à E)



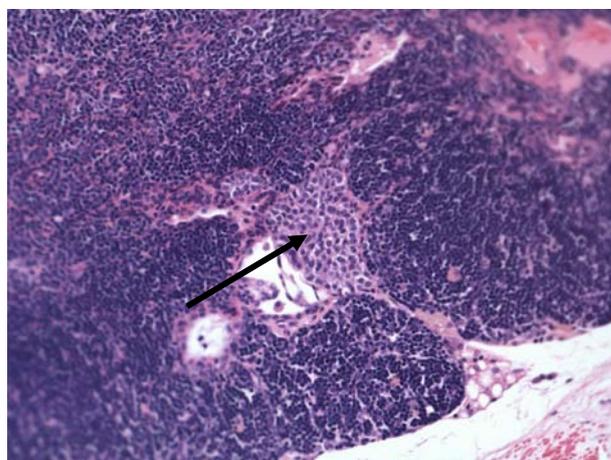
A: atrophie thymique modérée avec déplétion lymphocytaire (thymus, HE, x4)



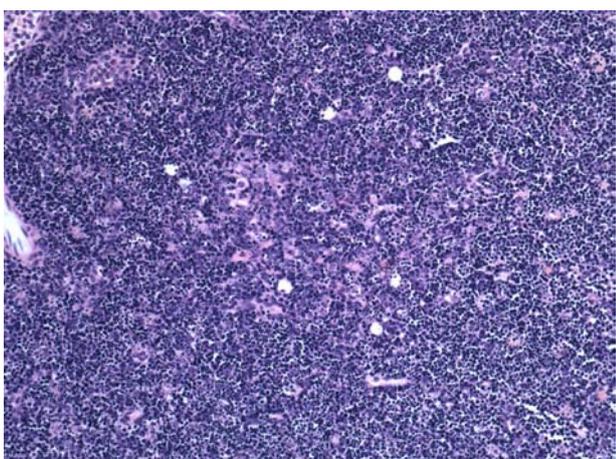
D : kyste (flèche) (thymus, HE, x2,5)



B: atrophie thymique modérée avec déplétion lymphocytaire (thymus, HE, x20)



E: ectopie de glande parathyroïde (flèche) (thymus, HE, x20)



C: aspect en ciel étoilé lors d'atrophie (thymus, HE, x20)

L'ectopie la plus fréquemment observée dans nos études était celle de la glande parathyroïde dans le thymus (15,1% et 16,9% chez les mâles et les femelles, respectivement). Histologiquement, la glande ectopique était adjacente au thymus ou enchâssée dans le parenchyme (**Figure 22-E**).

◆ Discussion

Histologiquement, il est difficile de faire la différence entre une involution et une atrophie du thymus. L'involution thymique est un processus physiologique normal qui débute à partir de la maturité sexuelle chez la souris (Ward *et al.*, 1999). Au fur et à mesure de l'involution, il y a une diminution de la population lymphoïde, plus marquée dans le cortex, et le réseau de cellules épithéliales devient plus proéminent, avec formation de kystes. A la fin du processus, le thymus est presque entièrement remplacé par du tissu adipeux. Le fait de rapporter et de grader cette involution peut permettre au pathologiste de mettre en évidence une accélération de l'involution ou une atrophie induite par le traitement. L'atrophie induite du thymus peut se faire selon au moins trois mécanismes (Gopinath *et al.*, 1987):

- Une hyperactivité cortico-surrénalienne liée au stress (toxicité générale),
- Une diminution de la sécrétion de l'hormone de croissance,
- Une toxicité directe du produit (immunosuppresseur).

Les principaux exemples de toxiques immunosuppresseurs sont : la cyclosporine, le cyclophosphamide, les œstrogènes et les corticostéroïdes.

Les kystes du thymus sont souvent observés chez la souris âgée et sont associés à l'involution. Ils représentent soit une dilatation de structures épithéliales tubulaires soit des restes embryonnaires du conduit thymopharyngé.

L'ectopie de la glande parathyroïde est rapportée avec une incidence de 0.8% chez les femelles B6C3F1 des études du NTP (Ward *et al.*, 1999). Il semblerait que l'incidence soit beaucoup plus importante chez la C57BL/6, dans les deux sexes.

Au cours du développement embryonnaire, le thymus et la glande parathyroïde migrent ensemble caudalement au 13^e jour de la gestation et se séparent le 15^e jour quand le thymus migre dans le thorax.

G. Lésions du système nerveux et de l'œil

1) Lésions du système nerveux

◆ Résultats

L'incidence des lésions observées dans le système nerveux est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 16: Lésions observées dans le système nerveux

<i>Lésion</i>	<i>Mâles</i>				<i>Femelles</i>			
	Incidence totale	% total	% min.	% max.	Incidence totale	% total	% min.	% max.
Encéphale								
Minéralisation du thalamus	170/350	48.6	22	66	132/350	35.1	12	54
Dilatation ventriculaire	2/350	0,6	0	2	2/350	0,6	0	2
Kyste(s) épithélial	0/350	0,0	0	0	1/350	0,3	0	2
Moelle épinière								
Kyste(s) épithélial	1/349	0,3	0	2	3/348	0.9	0	4

La lésion la plus fréquemment notée dans les deux sexes a été une minéralisation du thalamus. Histologiquement on a observé des dépôts minéralisés extracellulaires au niveau du thalamus, de façon bilatérale (voir §A.3).

Une dilatation ventriculaire, ou hydrocéphalie, a été observée avec une très faible incidence (0.4% chez les mâles et 0.8% chez les femelles). La lésion correspondait le plus souvent à une dilatation faible à modérée des ventricules latéraux, non détectable macroscopiquement (le cerveau étant fixé entièrement dans le formol, sans recoupe préalable).

Des kystes épithéliaux ont été observés chez quelques animaux dans le cerveau et dans la moelle épinière. Il s'agissait de kystes bordés par un épithélium de type squameux et remplis de kératine lamellaire, localisés au contact des méninges (**Figure 23-A, B**).

◆ Discussion

L'hydrocéphalie congénitale est bien décrite chez la souris de laboratoire (The Jackson Laboratory, 2003). Elle peut être causée par un blocage du flux normal de liquide céphalo-rachidien, par un défaut d'absorption ou plus rarement par une surproduction par les plexus choroïdes. Les animaux gravement atteints présentent une déformation de la boîte crânienne en dôme et des signes cliniques (dépression, ataxie). Ces animaux sont en général facilement détectés par l'éleveur et éliminés de la production.

Chez la C57BL/6J, la cause est inconnue. L'hydrocéphalie peut être acquise suite à une infection virale (polyoma virus, reovirus, Theiler's murine encephalomyelitis virus, ou lymphocytic choriomeningitis virus). Au cours de nos études, l'hydrocéphalie a été une cause de mort chez un mâle (voir §I.A.2).

Les kystes épithéliaux du système nerveux central sont assez fréquents chez la souris ou le rat de laboratoire (Kulwich, 1994). Ce sont des anomalies congénitales, situées le plus souvent le long de la ligne médiane et dont la taille augmente avec l'âge. Ces kystes sont rarement associés à des manifestations cliniques et sont découverts fortuitement à l'analyse histologique.

2) Lésions de l'œil, du nerf optique et de la glande de Harder

L'incidence des lésions observées dans ces organes est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 17 : Lésions observées dans l'œil, le nerf optique et la glande de Harder

<i>Lésion</i>	<i>Mâles</i>				<i>Femelles</i>			
	Incidence totale	% total	% min.	% max.	Incidence totale	% total	% min.	% max.
Œil								
Cataracte	168/350	48.0	4	82	167/350	47.7	4	80
Inflammation péri-orbitale	57/350	16.3	4	30	58/350	16.6	0	30
Kératite	13/350	3.7	0	8	31/350	8.9	4	16
Atrophie/dégénérescence rétinienne	9/350	2,6	0	10	7/350	2,0	0	4
<i>Phthisis bulbi</i>	4/350	1,1	0	2	2/350	0,6	0	2
Nerf optique								
Atrophie/dégénérescence	12/335	3.6	0	11	21/331	6.3	0	17
Glande lacrymale de Harder								
Inflammation chronique	52/350	14.9	10	24	35/350	10,0	0	20

◆ Résultats

La lésion oculaire la plus fréquemment observée dans les deux sexes a été la cataracte (environ 48% des animaux). Histologiquement, on a observé une dégénérescence du cristallin, le plus souvent bilatérale, multifocale à diffuse, d'intensité faible à modérée. Les lésions les plus précoces ont été observées au niveau de l'épithélium postérieur du cristallin. Les cellules épithéliales apparaissaient hypertrophiées, ballonnées et parfois vacuolisées, avec un cytoplasme hyper éosinophile et granuleux (**Figure 23-C**). Dans les stades plus avancés, on a pu observer des corpuscules de Morganian. Une minéralisation dystrophique a été parfois associée.

Une kératite (inflammation de la cornée) a été observée chez 3.7% des mâles et 8.9% des femelles. La lésion était caractérisée histologiquement par une infiltration de la cornée par des granulocytes neutrophiles, des lymphocytes et des plasmocytes, un œdème du stroma cornéen et une néovascularisation. Dans les cas chroniques, l'épithélium cornéen était hyperplasique et une érosion ou une ulcération de la cornée était présente dans les cas les plus sévères (**Figure 23-D, E**).

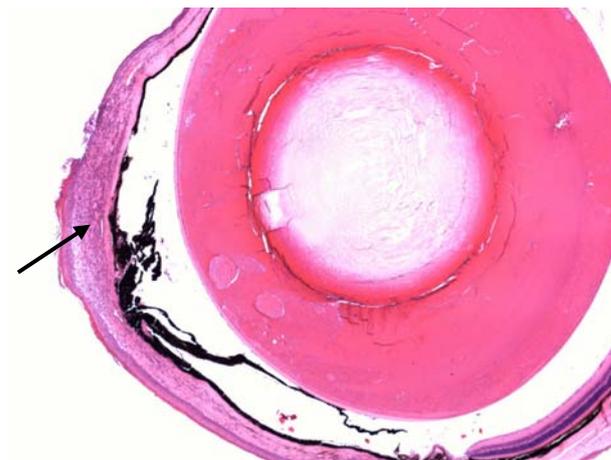
Une panophtalmite chronique sévère (*phthisis bulbi*) a été diagnostiquée avec une faible incidence dans les deux sexes. Cette lésion était caractérisée par une atrophie du bulbe oculaire avec une désorganisation des différentes structures de l'œil et un remplacement par du tissu fibreux (**Figure 23-F**).

On a observé une atrophie ou une dégénérescence de la rétine chez environ 2% des animaux. Histologiquement, on a observé une absence focale (en périphérie) ou diffuse de la couche des photorécepteurs et de la couche nucléaire externe. Dans les cas sévères, seule une couche fibreuse avec quelques cellules gliales persistait. La lésion était unilatérale ou bilatérale.

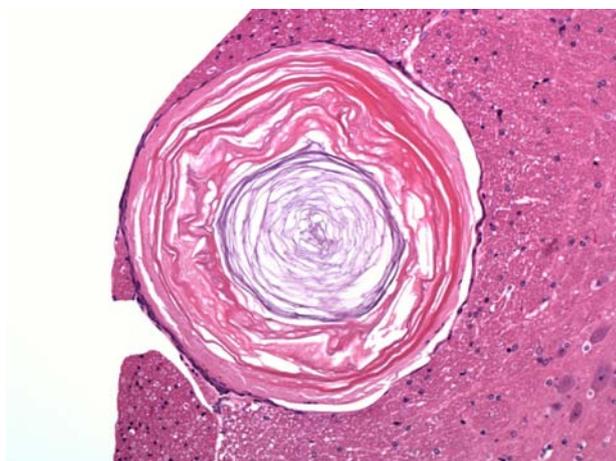
Figure 23 : Lésions observées dans le système nerveux central et l'œil (A à F)



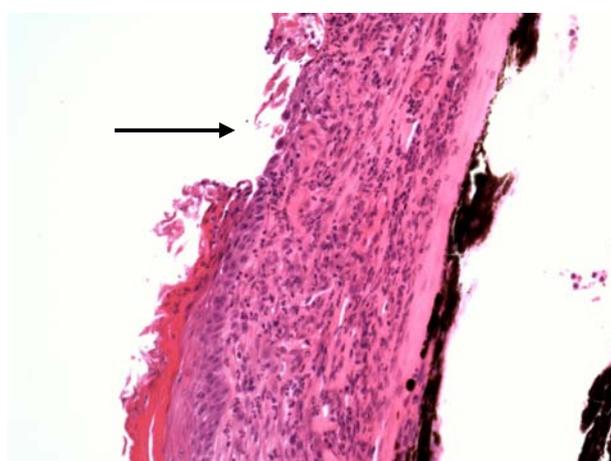
A: kyste épithélial (flèche) (moelle épinière, HE, x4)



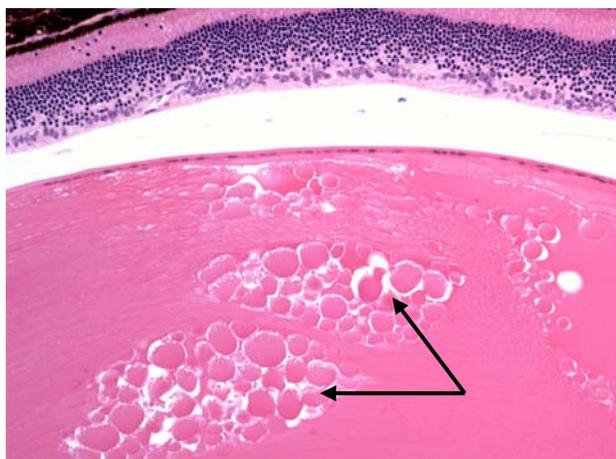
D: kératite (fleche) (œil, HE, x4)



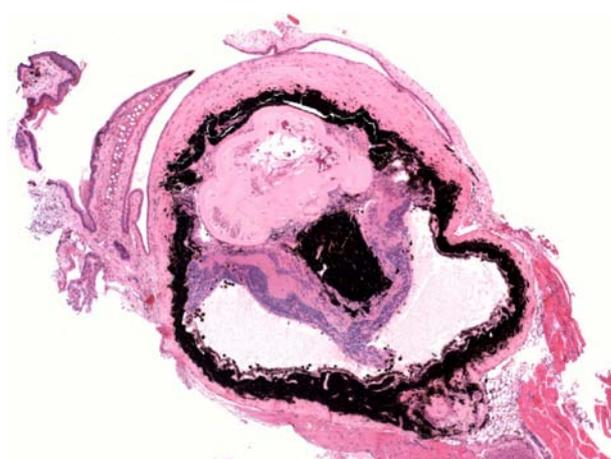
B: kyste épithélial avec kératine lamellaire (moelle épinière, HE, x20)



E: kératite avec érosion (flèche) de l'épithélium cornéen (œil, HE, x20)



C: cataracte avec corpuscules de Morgagnian (flèches) (œil, HE, x20)



F: *phthisis bulbi* (œil, HE, x4)

◆ Discussion

La cataracte est une lésion dégénérative très fréquente chez la souris âgée (Volker et Yoshitomi, 1999). La cataracte mature est plutôt rare chez la B6C3F1 alors que la cataracte postérieure sous-capsulaire focale est beaucoup plus fréquente. C'est aussi le cas dans nos études. La lésion serait plus fréquente chez la souris (souche CD-1) que chez le rat (Sprague Dawley). Cependant, une différence entre les souches est à prendre en considération.

La pathogénie de la cataracte sénile implique plusieurs facteurs (Lee *et al.*, 1995):

- Un stress oxydatif lié à une diminution de l'activité de l'enzyme superoxyde dismutase,
- Une diminution de la concentration de GSH (glutathione sous forme réduite),
- La formation de radicaux libres dans le cristallin, l'humeur aqueuse et le corps vitré avec pour conséquence une peroxydation des lipides.

L'inflammation de la cornée chez la souris de laboratoire peut être d'origine infectieuse, secondaire à un traumatisme (prise de sang au niveau du sinus rétro-orbitaire par exemple), secondaire à une sécheresse de l'œil chez les animaux moribonds, ou secondaire à une irritation chimique (augmentation de la concentration d'ammoniac dans l'environnement suite à une prolifération de bactéries uréase positives dans la litière souillée) (Frame et Slone, 1996). Dans nos études, la cause la plus fréquente est une séquelle de la ponction du sinus rétro-orbitaire. En cas de traumatisme important, une panophtalmite chronique s'installe et peut aboutir à une atrophie du globe oculaire, avec une désorganisation ou une disparition des structures normales de l'œil (*phthisis bulbi*).

La dégénérescence sénile de la rétine est une lésion peu fréquente chez les souris comme la C57BL/6, à cause de leur pigmentation naturelle et l'absence associée de photosensibilité (Volker et Yoshitomi, 1999). Cette lésion est beaucoup plus fréquente et sévère chez le rat albinos Wistar, par exemple au cours des études de cancérogenèse (observation personnelle).

H. Peau, os, muscle

L'incidence des lésions observées dans ces organes est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 18 : Incidence des lésions observées dans la peau, l'os et le muscle

<i>Lésion</i>	<i>Mâles</i>				<i>Femelles</i>			
	Incidence totale	% total	% min.	% max.	Incidence totale	% total	% min.	% max.
Peau								
Dermatite ulcéreuse chronique	15/342	4,4	2	6	17/341	5.0	0	13
Os (sternum)								
Lésion fibro-osseuse	13/348	3.7	0	8	182/349	52.1	28	80
Dégénérescence cartilagineuse	27/348	7,8	2	14	9/349	2,6	0	6
Os (vertèbre)								
Lésion fibro-osseuse	18/349	5,2	0	18	144/348	41.4	12	60
Articulation fémoro-tibiale								
Lésion fibro-osseuse	24/345	7.0	2	10	204/344	59.3	42	78
Dégénérescence articulaire	4/345	1.2	0	4	2/344	0,6	0	2
Muscle strié squelettique								
Infiltrat de cellules mononucléées	10/348	2.9	0	6	14/350	4,0	0	8
Atrophie/dégénérescence	1/348	0,3	0	2	8/350	2.3	0	6

1) Dermatite ulcéreuse chronique

◆ Résultats

Une dermatite ulcéreuse chronique a été observée chez 4.4% des mâles et 5% des femelles. Cette lésion était caractérisée histologiquement par une nécrose et une ulcération de l'épiderme, une inflammation chronique du derme avec formation d'un tissu de granulation, une fibroplasie plus ou moins importante, un infiltrat inflammatoire mixte (granulocytes neutrophiles, lymphocytes, plasmocytes) et une hyperplasie réactive de l'épiderme aux marges de l'ulcère (**Figures 24 et 25**).

Figure 24: Dermatite ulcéreuse chronique (peau, HE, x4). Une large ulcération de l'épiderme est visible au centre de la photo (zone délimitée par les deux flèches).

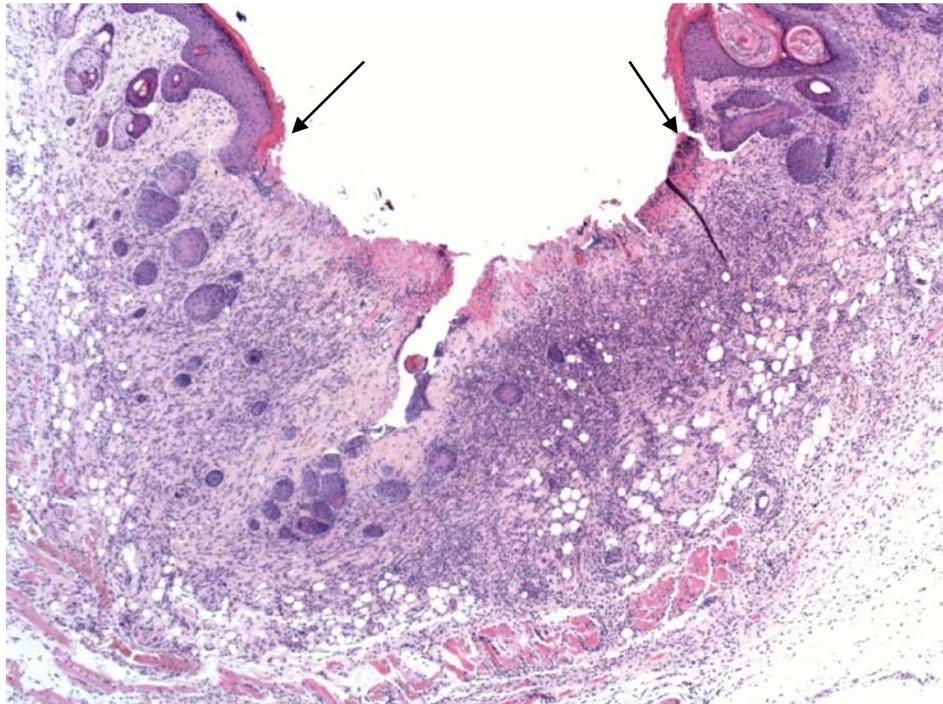
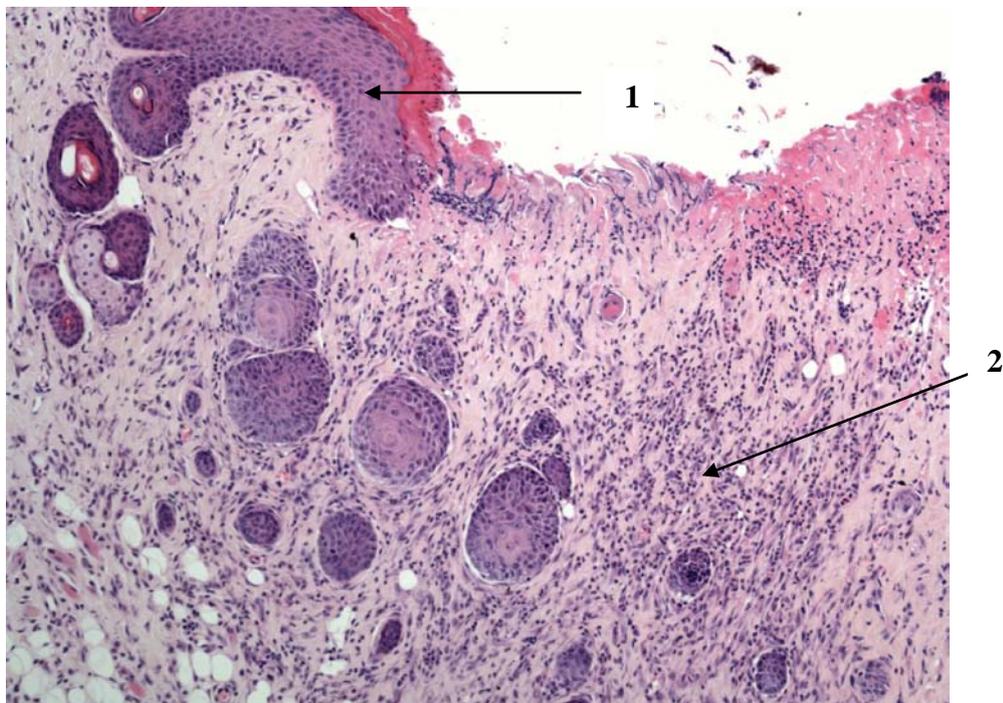


Figure 25 : Dermatite ulcéreuse chronique (peau, HE, x10). L'épiderme en marge de l'ulcération est hyperplasique (1) ; un tissu de granulation est présent dans le derme (2)



◆ Discussion

Cette lésion cutanée est bien décrite chez les souris au pelage noir et notamment chez la souris C57BL/6 (Sundberg *et al.*, 1996). Les deux sexes sont également affectés dans cette souche, ce qui est le cas dans nos études. Le nombre de cas augmente avec l'âge.

La lésion débute par une dermatite papuleuse localisée le plus souvent au niveau du dos. Cliniquement, on observe des papules rouge foncé au sein de plages d'alopecie. Au fur et à mesure que la maladie progresse, les papules s'agrandissent et s'ulcèrent. Si les ulcères cicatrisent, des rétractations cutanées invalidantes pour l'animal peuvent se produire. Lorsque les lésions dépassent 2 cm de diamètre, il est recommandé de sacrifier l'animal pour des raisons éthiques. Différents traitements ont été testés mais sans grande efficacité. Une supplémentation en vitamine E serait un traitement prometteur (Lawson *et al.*, 2005). Au cours de nos études, les animaux euthanasiés pour raison éthique à cause d'une dermatite ulcéreuse ont représenté 20% des mâles et 28% des femelles, soit de loin la cause de « sortie » la plus fréquente (voir §I.A.2).

L'étiologie de cette dermatite reste inconnue. Les analyses bactériologiques ont permis d'isoler *Staphylococcus aureus* dans certains cas, mais cet agent serait plutôt responsable d'une surinfection secondaire (Percy et Barthold, 2007). D'autres bactéries opportunistes ont été isolées : *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus* species, *Proteus mirabilis* et *Enterococcus* species (Sundberg *et al.*, 1994). Le régime alimentaire serait également un facteur déterminant. Enfin, l'observation de dépôts d'immuns complexes dans la paroi des vaisseaux suggèrerait une vasculite auto-immune à l'origine des lésions (Andrews *et al.*, 1994).

2) Lésion fibro-osseuse

◆ Résultats

Une lésion fibro-osseuse a été observée dans tous les os examinés (sternum, vertèbre, fémur) principalement chez les femelles (41 à 59% des femelles contre 3.7 à 7% des mâles). Il s'agit d'une lésion de la cavité médullaire. Histologiquement, la lésion débutante a été observée au niveau de la métaphyse et était caractérisée par la prolifération d'un stroma fibro-vasculaire, associée à une résorption osseuse par un front d'ostéoclastes. Dans les lésions plus avancées, la prolifération fibro-vasculaire était présente dans la diaphyse et on a observé une prolifération des ostéoblastes avec un épaissement des trabécules osseux de la métaphyse (**Figures 26 et 27**).

◆ Discussion

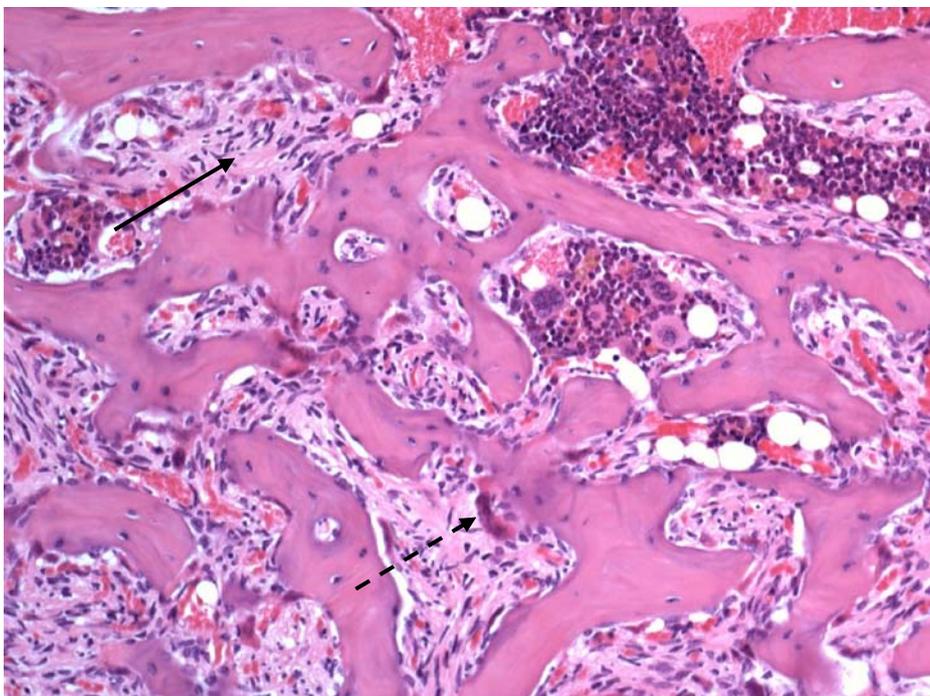
Le terme de « lésion fibro-osseuse » (LFO) désigne la lésion osseuse spontanée autrefois diagnostiquée sous plusieurs appellations différentes : ostéodystrophie fibreuse, hyperostose, myélofibrose, ostéofibrose ou ostéosclérose. La LFO est la lésion osseuse la plus fréquente chez la femelle B6C3F1 et elle apparaît dès 32 semaines d'âge (Albassam *et al.*, 1991). Son incidence varie de 40 à 100% chez la femelle B6C3F1 âgée et de 0 à 1% chez le mâle âgé. On a observé un résultat comparable dans nos études avec la C57BL/6. La LFO peut être observée dans tous les os mais elle plus fréquente dans les sternèbres, les os longs et les vertèbres. A partir de 110 semaines d'âge, la lésion occupe jusqu'aux 2/3 de la cavité médullaire. La LFO est associée à une augmentation de la concentration plasmatique en phosphatase alcaline mais sans aucune modification hématologique. Histologiquement, la LFO ressemble à une ostéodystrophie fibreuse, à savoir une résorption osseuse ostéoclastique accélérée associée à une fibroplasie. Mais contrairement à l'ostéodystrophie fibreuse, aucun syndrome d'hyperparathyroïdisme primaire ou secondaire n'est associé à la LFO. La LFO chez la souris présente de nombreuses similitudes avec les premiers stades de la maladie de Paget chez l'homme. Contrairement à cette maladie, on n'observe pas d'augmentation de l'incidence des fractures chez la souris.

L'étiologie de la LFO reste inconnue. Mais la prédisposition des femelles ainsi que l'association fréquente avec des ovaires kystiques et une hyperplasie endométriale kystique suggère le rôle possible d'un déséquilibre œstrogénique dans la pathogénie de cette lésion (Gervais et Attia, 2005).

Figure 26 : Lésion fibro-osseuse (flèche) au sein d'une sternèbre (HE, x4)



Figure 27 : Lésion fibro-osseuse au sein d'une sternèbre, avec prolifération fibroblastique (flèche continue) et résorption ostéoclastique (flèche discontinue) (HE, x20)



3) Dégénérescence articulaire et dégénérescence cartilagineuse

◆ Résultats

Au sein de l'articulation fémoro-tibiale, une dégénérescence articulaire a été observée chez 1.2% des mâles et 0.6% des femelles. Histologiquement, on a observé une érosion du cartilage, avec la formation de fissures et une perte de substance, la formation de groupes de chondrocytes, un épaissement de l'os sous-chondral, avec parfois la formation de pseudo-kystes sous-chondraux.

Une dégénérescence cartilagineuse focale à multifocale a été observée dans le sternum chez 7.8% des mâles et 2.6% des femelles. Histologiquement, des foyers de nécrose du cartilage articulaire avec disparition des chondrocytes et désintégration du cartilage ont été observés. Autour de la lésion, un regroupement des chondrocytes était parfois présent, indiquant une tentative de réparation du cartilage. Dans les stades avancés, seules des cavités kystiques étaient présentes.

◆ Discussion

La dégénérescence articulaire est une lésion non inflammatoire, progressive, spontanée avec destruction du cartilage articulaire, associée à un épaissement de l'os sous-chondral, à la formation de kystes osseux et d'ostéophytes. Cette affection est bien décrite dans l'articulation du genou de la souris B6C3F1 âgée, mais avec une incidence faible (0 à 2% chez les mâles et 0 à 4% chez les femelles) (Long et Leininger, 1999). Ceci est comparable à nos résultats chez la souris C57BL/6.

La pathogénie de cette lésion reste à élucider. La prédisposition des mâles par rapport aux femelles dans certaines souches a conduit vers l'hypothèse d'un dysfonctionnement hormonal. Des expériences de modification du statut hormonal ont été menées (Silberberg et Silberberg, 1970) et ont montré que :

- Une administration d'œstrogènes diminue l'incidence des lésions dans les deux sexes,
- Une administration d'androgènes augmente l'incidence chez les mâles intacts et chez les femelles stérilisées.

L'âge, la nourriture (teneur en lipides par exemple) et le poids corporel sont aussi des facteurs qui influencent également l'apparition et la progression de la dégénérescence articulaire.

La dégénérescence cartilagineuse focale observée dans le sternum de nos souris C57BL/6 est bien décrite chez la B6C3F1 dans les deux sexes (Long et Leininger, 1999). L'étiologie de cette lésion reste inconnue.

III. LÉSIONS PRE-TUMORALES ET TUMORALES

A. Incidence globale des tumeurs

◆ Résultats

L'incidence des tumeurs rencontrées au cours de nos études est présentée en Annexe (Annexes 7 et 8).

D'un point de vue global, le nombre de tumeurs observé a été beaucoup plus important chez les femelles que chez les mâles : en effet, 42% des femelles ont été retrouvées avec une ou plusieurs tumeurs primitives, bénignes ou malignes, contre seulement 19% des mâles.

Dans les deux sexes, les tumeurs bénignes ont été au moins deux fois plus fréquentes que les tumeurs malignes.

L'incidence des tumeurs a été très variable d'une étude à l'autre ; en effet, la variabilité observée a été très importante dans les deux sexes : 6 à 30% des mâles et 24 à 66% des femelles étaient porteurs de tumeur(s) primitive(s) selon les études.

Les différents types de tumeurs observées sont détaillés en **Annexe 9**.

Les tumeurs les plus fréquemment observées chez les mâles ont été :

- Lymphome malin (4.9%),
- Adénome bronchiolo-alvéolaire du poumon (4.9%),
- Adénome de la glande de Harder (2.3%),
- Adénome hépatocellulaire (1.7%).

Les tumeurs les plus fréquemment observées chez les femelles ont été :

- Adénome de la pars distalis de l'hypophyse (23%),
- Lymphome malin (9.7%),
- Adénome bronchiolo-alvéolaire du poumon (3.2%),
- Fibrosarcome sous-cutané (2.6%),
- Adénome folliculaire thyroïdien (2.3%).

Hormis l'adénome hypophysaire qui a été de loin la tumeur la plus fréquente chez les femelles uniquement, les deux tumeurs les plus fréquentes tout sexe confondu ont été le lymphome malin et l'adénome bronchiolo-alvéolaire du poumon.

Les deux seules tumeurs retrouvées dans toutes les études ont été l'adénome hypophysaire et le lymphome malin chez les femelles. Pour les autres tumeurs, la variabilité a été très importante

d'une étude à l'autre. C'est le cas par exemple pour l'adénome bronchiolo-alvéolaire du poumon, qui a été diagnostiqué chez 0 à 16% des mâles selon les études.

Parmi les tumeurs moins fréquemment observées, c'est-à-dire dont l'incidence a été comprise entre 0.9 et 1.7% (soit environ 3/350 à 6/350 animaux), on a trouvé :

- phéochromocytome de la surrénale, hémangiome hépatique et fibrosarcome sous-cutané chez les mâles,
- adénome de la glande de Harder, sarcome histiocytaire, adénome hépatocellulaire, polype endométrial stromal de l'utérus et sarcome à cellules fusiformes dans le tissu sous-cutané chez les femelles.

◆ Discussion

Comparaison avec la souche B6C3F1

Les résultats que nous avons obtenu chez la souche C57BL/6 sont assez différents de ceux qui sont publiés chez la souris B6C3F1 (Haseman *et al.*, 1999). L'**annexe 10** présente l'incidence des tumeurs observées chez la souris B6C3F1 au cours de 27 études de cancérogénèse.

Dans cette souche, l'incidence globale des tumeurs tous sites confondus est plus importante que celle que nous avons observé chez la souris C57BL/6 : 70.7% des mâles et 68.3% des femelles étaient porteurs d'une ou plusieurs tumeurs bénignes et/ou malignes (contre 19% et 42% respectivement chez la C57BL/6).

Contrairement à ce que nous avons observé chez la souche C57BL/6 :

- il n'y a pas de différence de sexe en ce qui concerne l'incidence globale des tumeurs chez la souris B6C3F1,
- l'incidence des tumeurs bénignes est comparable à celle des tumeurs malignes dans les deux sexes chez la B6C3F1.

En ce qui concerne les différents types de tumeurs, les tumeurs de loin les plus fréquemment observées chez la B6C3F1 sont les tumeurs du foie (adénomes et carcinomes), avec une incidence de 42% chez les mâles et 24% chez les femelles. Les autres tumeurs les plus fréquentes dans cette souche sont :

- les tumeurs du poumon (20.5%), les lymphomes malins (8.3%), les hémangiomes ou hémangiosarcomes (5.9%) et les tumeurs des glandes de Harder (5.4%) chez les mâles,
- les lymphomes malins (20.9%), les adénomes hypophysaires (14.8%), les tumeurs du poumon (8.1%), les hémangiomes ou hémangiosarcomes (4.3%) et les tumeurs des glandes de Harder (4.0%) chez les femelles.

En conclusion, la principale différence avec la souche C57BL/6 dans nos études est une incidence beaucoup moins forte des tumeurs hépatiques, avec une absence des adénocarcinomes hépatocellulaires. Les autres types de tumeurs sont représentés fréquemment dans les deux souches, à l'exception de l'adénome folliculaire de la thyroïde qui représente la cinquième tumeur chez la souris mâle C57BL/6 et qui a été peu observée chez la B6C3F1 (1.8%).

Concernant la variabilité observée au cours des 27 études de cancérogenèse du NTP, de nombreux facteurs ont pu influencer l'incidence des tumeurs (Haseman *et al.*, 1989): les procédures utilisées pour l'autopsie et l'histopathologie, le poids corporel, le régime alimentaire, l'hébergement, les facteurs environnementaux, la durée de l'étude et les différences de survie. Les deux facteurs les plus importants pour avoir les données historiques les plus fiables sont : le temps (études les plus récentes, datant de moins de 10 ans) et le lieu (même laboratoire). Ces deux facteurs sont respectés en ce qui concerne les données rapportées dans ce travail.

Comparaison avec la souche CD-1

L'**annexe 11** présente l'incidence des tumeurs observées chez la souris CD-1 au cours de 59 études de cancérogenèse (Giknis et Clifford, 2005). En ce qui concerne les différents types de tumeurs, les tumeurs les plus fréquemment observées chez la souris CD-1 sont les tumeurs du poumon et les tumeurs du foie (chez les mâles seulement). Les tumeurs les plus fréquentes dans cette souche sont :

- les adénomes du poumon (14.3%), les adénomes hépatocellulaires (10.5%), les adénocarcinomes du poumon (7.4%), les adénocarcinomes hépatocellulaires (5.8%), les adénomes des glandes de Harder (5.2%) et les lymphomes malins (4.5%) chez les mâles,
- les lymphomes malins (9.9%), les adénomes du poumon (9.5%), les polypes de type stromal de l'utérus (5.1%), les sarcomes histiocytaires (4.9%) et les adénocarcinomes du poumon (4.6%) chez les femelles.

Comme dans la souche C57BL/6, les tumeurs du poumon, les lymphomes malins et les adénomes de la glande de Harder sont parmi les tumeurs les plus fréquentes.

Contrairement à ce que nous avons observé chez la souris C57BL/6:

- les tumeurs hépatocellulaires sont très représentées chez les mâles CD-1 (10.5% contre 1.7% pour les adénomes), et notamment les adénocarcinomes qui n'ont pas été observés dans nos études,
- les tumeurs malignes du poumon sont très représentées,
- les polypes endométriaux et les sarcomes histiocytaires (systémiques) sont très fréquents chez les femelles CD-1,

- l'adénome hypophysaire est une tumeur peu fréquente chez les femelles CD-1 (2.1% contre 23% chez la femelle C57BL/6),
- l'adénocarcinome de la glande mammaire est une tumeur présente chez les femelles CD-1 (1.65% avec une variabilité de 0 à 8% selon les études) alors qu'elle n'a pas été observée chez la femelle C57BL/6,
- la seule tumeur retrouvée dans toutes les études avec la souris CD-1 est l'adénome hépatocellulaire (mâles), alors qu'il s'agit de l'adénome hypophysaire et du lymphome malin dans les études avec la souris C57BL/6 (femelles).

L'hétérogénéité des tumeurs observées d'une étude à l'autre peut paraître étonnante chez des souris ayant le même patrimoine génétique (souche consanguine) et ayant évolué dans un même environnement. On peut émettre l'hypothèse que la cause de cette hétérogénéité est épigénétique.

B. Relation entre lésion pré-tumorale et lésion tumorale

D'un point de vue général, il existe une bonne corrélation entre l'incidence de la lésion pré-tumorale et celle de la lésion tumorale observée (voir **Annexe 12**), par exemple :

- hyperplasie focale de la pars distalis (62.4% des femelles) et adénome hypophysaire (23% des femelles),
- hyperplasie lymphoïde (12.7% des mâles dans le nœud lymphatique mésentérique et 13.2% des femelles dans la rate) et lymphome malin,
- hyperplasie folliculaire dans la thyroïde (37.6% des femelles) et adénome folliculaire thyroïdien (2.3% des femelles),
- hyperplasie bronchiolo-alvéolaire (5.2% des mâles) et adénome bronchiolo-alvéolaire (4.9% des mâles).

A l'inverse, certaines lésions pré-tumorales très fréquemment observées n'ont pas été associées à la présence de la tumeur correspondante :

- dans la glande surrénale, une hyperplasie sous-capsulaire a été observée chez 98,3% des femelles et 42.4% des mâles et seul un adénome sous-capsulaire a été diagnostiqué (chez un mâle),
- dans l'estomac, une hyperplasie focale de la muqueuse non glandulaire a été observée chez environ 25% des animaux contre aucun papillome,
- dans l'ovaire, une hyperplasie tubulaire focale a été observée chez 26.7% des femelles contre aucun adénome.

C. Lésions tumorales les plus fréquemment observées

1) Adénome hypophysaire

◆ Résultats

L'adénome hypophysaire de la pars distalis a été de loin la tumeur la plus fréquente chez la femelle C57BL/6, et elle a été observée dans toutes les études (de 8 à 42%). Par contre, aucun adénome n'a été observé chez les mâles. La très forte incidence chez les femelles a été associée à une forte incidence d'hyperplasie focale de la pars distalis (62.4%).

Histologiquement, on a observé une lésion proliférative bien délimitée, non encapsulée et compressive, composée de cellules polygonales avec un cytoplasme abondant éosinophile ou amphophile et un noyau vésiculeux. Les cellules étaient organisées en nappe ou en cordons. Des atypies nucléaires ont parfois été observées et l'index mitotique était faible à modéré. Une angiectasie était parfois présente au sein de la tumeur (**Figures 28 et 29**).

La distinction entre l'hyperplasie et la tumeur bénigne étant parfois difficile, les critères présentés dans le tableau ci-après ont été appliqués.

Tableau 19 : Critères de distinction entre hyperplasie et adénome de la pars distalis dans l'hypophyse (Mohr *et al.*, 2001)

	<i>Hyperplasie focale</i>	<i>Adénome</i>
Taille de la lésion	Diamètre inférieur à 50% de la hauteur de l'hypophyse	Diamètre supérieur à 50% de la hauteur de l'hypophyse
Croissance	Focale ou multifocale, sans compression ou avec compression mineure du parenchyme adjacent	Bien délimitée, expansive, avec compression du parenchyme adjacent par au moins un quart de la lésion
Aspect cytologique	Taille et coloration variables des cellules par rapport au parenchyme normal	Grandes cellules au cytoplasme éosinophile en général
Atypies nucléaires	Absentes	Absentes ou présentes*
Vascularisation	Normale ou avec ectasie vasculaire	Angiectasie fréquente avec parfois cavités kystiques, hémorragiques

* : la présence d'atypies nucléaires n'est pas un critère de malignité. Le diagnostic de carcinome repose sur la présence d'une invasion des tissus locaux (cerveau) ou de métastases.

Figure 28 : Adénome de la pars distalis (flèches) (hypophyse, HE, x4)

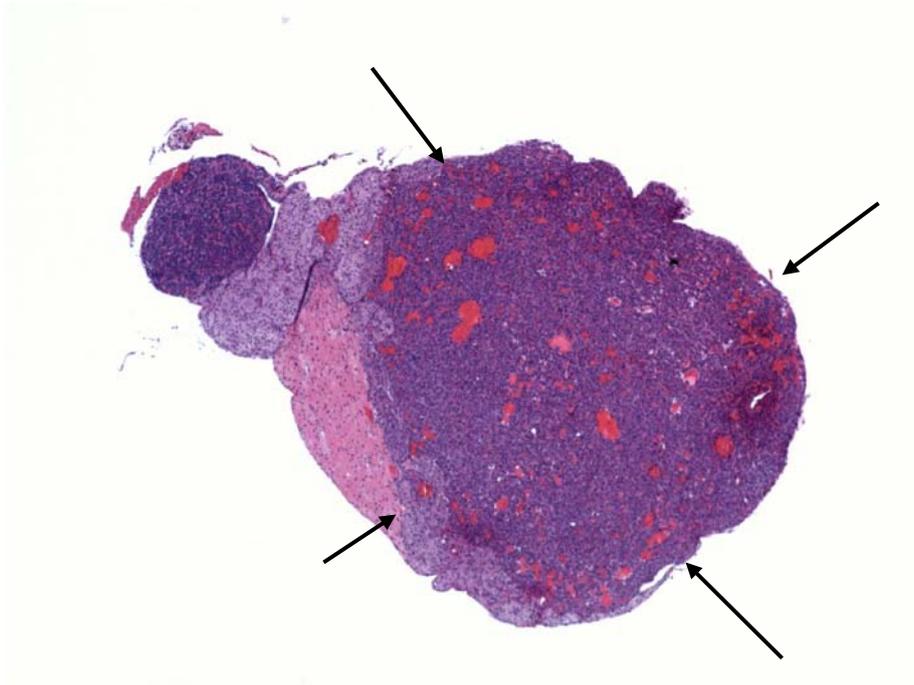
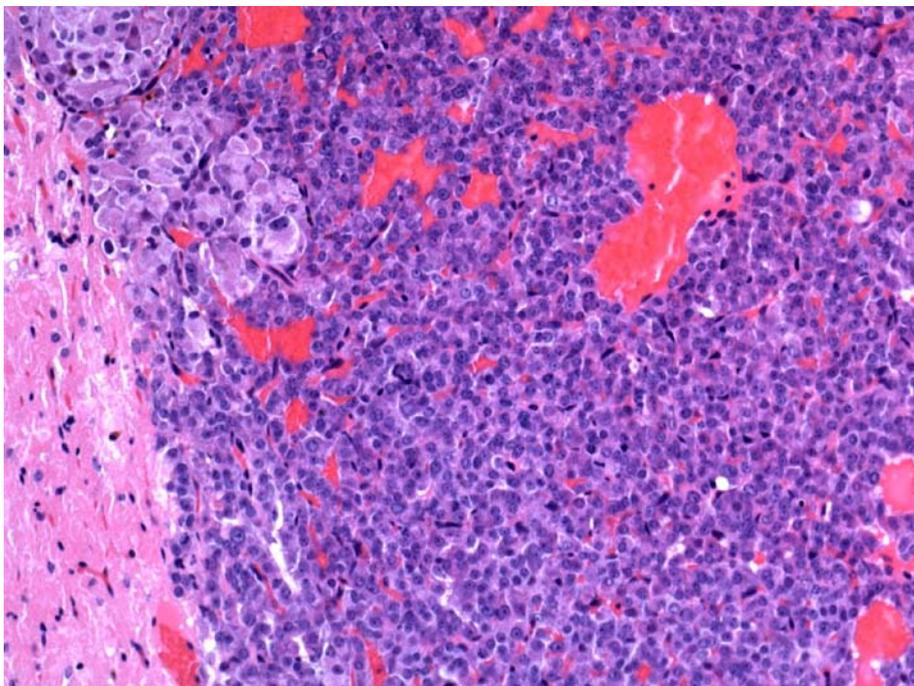


Figure 29: Adénome de la pars distalis (hypophyse, HE, x20)



◆ Discussion

Même si l'incidence rapportée des adénomes hypophysaires est très forte chez la souris, elle est inférieure à celle rapportée chez le rat (Mahler et Elwell, 1999). L'incidence est variable selon les souches, les souches C57BL ou les souches F1 avec un parent C57BL étant très susceptibles. Dans toutes les souches, les femelles sont nettement plus touchées que les mâles. Ceci est comparable avec ce que nous avons observé dans nos études.

L'identification de la cellule d'origine nécessite un recours à l'immunohistochimie (anti-prolactine, anti-GH, anti-ACTH, anti-LH, anti-FSH...). La majorité des tumeurs observées chez la souris sont positives pour la prolactine. Dans nos études, l'identification du type cellulaire précis n'a pas d'intérêt, sauf en cas d'augmentation du nombre de tumeurs dans les groupes traités ; dans ce cas, il deviendrait essentiel d'expliquer le mécanisme d'action et donc de connaître la nature des cellules tumorales.

2) Lymphome malin

◆ Résultats

Le lymphome malin a été la tumeur la plus fréquente chez les mâles et la seconde tumeur chez les femelles (**Annexe 9**). La tumeur a été le plus souvent observée chez les animaux en fin d'étude ; sur les 51 cas observés, seuls 9 animaux sont morts ou ont été euthanasiés en cours d'étude. Il s'agit d'une tumeur systémique et dans la plupart des cas plusieurs organes ont été concernés (lymphome multicentrique). Parmi les localisations les plus fréquentes, les nœuds lymphatiques mésentériques ont été de loin les plus touchés, dans plus de 70% des cas observés (**Tableau 20**). Les autres localisations les plus fréquentes ont été :

- les autres nœuds lymphatiques puis la rate chez les mâles,
- la rate puis le thymus chez les femelles.

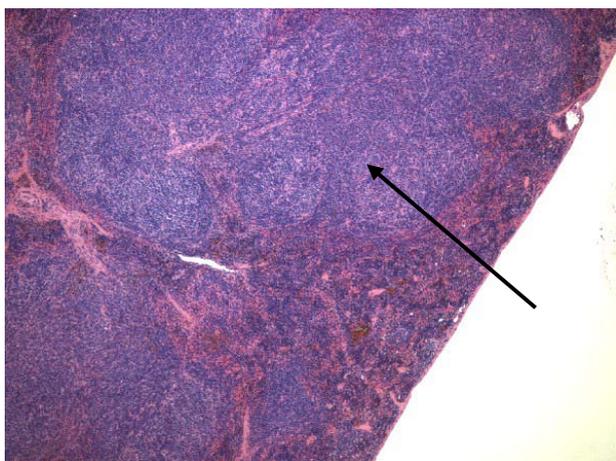
Parmi les organes non lymphoïdes, le foie a été infiltré chez 32% des femelles contre seulement 6% des mâles, chez lesquels d'autres organes non lymphoïdes ont été plus souvent infiltrés (47% des animaux).

Tableau 20 : Localisation des lymphomes malins observés au cours des études de cancérogenèse

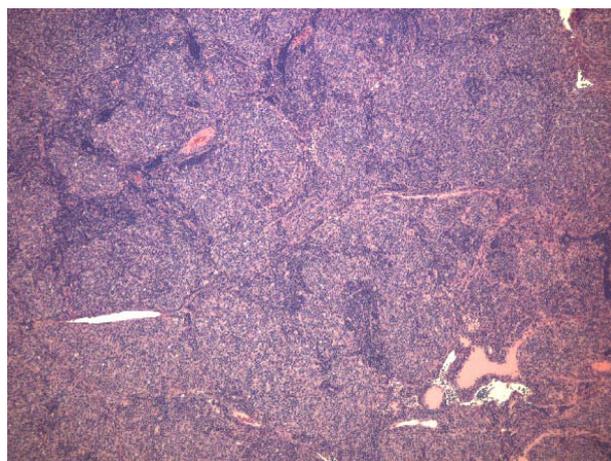
	<i>Nombre de mâles (%)</i>	<i>Nombre de femelles (%)</i>
Nombre de lymphomes malins	17	34
Localisations		
<i>Rate</i>	3 (18%)	16 (47%)
<i>Thymus</i>	1 (6%)	12 (35%)
<i>Nœud lymphatique mésentérique</i>	13 (76%)	24 (71%)
<i>Nœud lymphatique sous-maxillaire</i>	2 (12%)	9 (26%)
<i>Autres nœuds lymphatiques</i>	5 (29%)	11 (32%)
<i>Foie</i>	1 (6%)	11 (32%)
<i>Poumon</i>	1 (6%)	7 (21%)
<i>Autres organes non lymphoïdes</i>	8 (47%)	8 (24%)

Histologiquement, on a observé une prolifération de cellules rondes, au noyau à chromatine mottée et au cytoplasme peu visible. La population tumorale était le plus souvent hétérogène avec une population mixte de petits lymphocytes et de lymphoblastes, mais parfois homogène avec des cellules de petite taille (petits lymphocytes). L'anisocytose et l'anisocaryose étaient modérées (**Figure 30-A, D**).

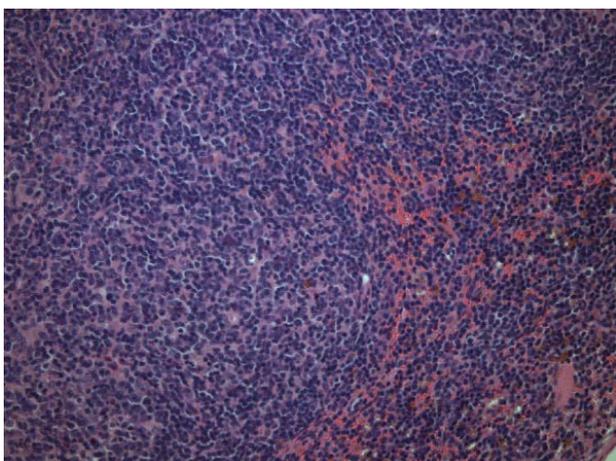
Figure 30 : Lésions de lymphome malin observées dans la rate et le nœud lymphatique mésentérique



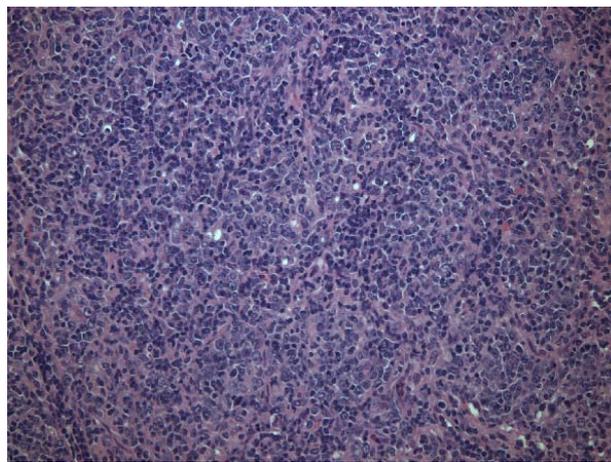
A : lymphome malin ayant remplacé la pulpe blanche (flèche) (rate, HE, x4)



C : architecture désorganisée par le lymphome malin (nœud lymphatique mésentérique, HE, x4)



B : cellules tumorales du lymphome malin (rate, HE, x20)



D : cellules tumorales du lymphome malin (nœud lymphatique mésentérique, HE, x20)

◆ Discussion

Le lymphome malin est une tumeur fréquente chez la souris de laboratoire, notamment la souris B6C3F1 (Ward *et al.*, 1999). La rate est l'organe lymphoïde le plus souvent touché dans cette souche, alors que le nœud lymphatique mésentérique semble être l'organe principal chez la C57BL/6. L'incidence est généralement faible chez les souris jeunes et augmente progressivement avec l'âge, pour atteindre un pic après 18 mois.

L'incidence du lymphome malin chez la souris C57BL/6 rapportée dans la littérature est de 17.1% chez les mâles et de 19.7% chez les femelles (Frith et Wiley, 1981). Ce résultat est différent de ce que nous avons observé dans nos études, au cours desquelles l'incidence a été deux fois plus importante chez les femelles (34%) que chez les mâles (17%).

La différenciation entre hyperplasie lymphoïde et lymphome malin débutant peut parfois être difficile pour le pathologiste, notamment dans la rate. Des critères histologiques, cytologiques et immuno-histochimiques permettent de faire la différence entre les deux lésions (Suttie, 2006), même si le diagnostic reste très difficile dans certains cas. Au cours de nos études, seuls les critères histologiques ont été appliqués. Ces critères sont rappelés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 21**). Le recours à une analyse immuno-histochimique n'aurait été justifiable qu'en cas d'augmentation de l'incidence chez les animaux traités.

Tableau 21 : Différenciation entre hyperplasie lymphoïde et lymphome malin (d'après Suttie, 2006)

	<i>Hyperplasie lymphoïde</i>	<i>Lymphome malin</i>
<i>Architecture</i>	Normale	Perte des structures normales
<i>Follicules/centres germinatifs</i>	Plus nombreux, plus volumineux	Absents
<i>Zone marginale</i>	Normale ou épaissie	Absente
<i>Manchons lymphoïdes pré- artériolaires</i>	Normaux, de taille augmentée ou diminuée	Absents
<i>Pulpe rouge</i>	Normale	Perte de structure normale
<i>Cytologie</i>	Population mixte normale	Monomorphe ou pléomorphe Cellules atypiques
<i>Clonalité</i>	Polyclonale	Monoclonale

Le diagnostic différentiel doit également être fait avec le sarcome histiocytaire, qui représente la tumeur hématopoïétique non lymphoïde la plus fréquente chez la souris, et qui est caractérisé par :

- des cellules rondes au cytoplasme abondant et éosinophile,
- la présence de cellules géantes plurinucléées,
- des foyers de nécrose entourés par des cellules tumorales palissadiques,
- une localisation primitive dans le nœud lymphatique mésentérique, l'utérus ou le foie,
- la présence parfois de gouttelettes hyalines (lysozyme) dans le cytoplasme des cellules proximales du rein (Hard et Snowden, 1991).

La classification des lymphomes malins chez la souris de laboratoire a été revue en 1983 (Pattengale et Frith, 1983) selon des critères immuno-morphologiques. Elle distingue les lymphomes de type:

- Folliculaire (à petites cellules, à grandes cellules ou mixte), de type B,
- Plasmocytaire, de type B,
- Immunoblastique, de type T ou B ou non-T non-B,
- A petits lymphocytes, de type B,
- Lymphoblastique, de type T ou B ou non-T non-B.

Toutes souches confondues, le lymphome de type folliculaire est de loin le plus fréquent (Frith *et al.*, 1996). Aussi appelé lymphome pléomorphe ou lymphome à cellules mixtes, il s'agit d'un lymphome à lymphocytes B. La rate, les nœuds lymphatiques mésentériques et les plaques de Peyer de l'iléum sont les sites les plus souvent atteints.

Une étude faite chez la souche C57BL/6 a rapporté l'influence de la ration alimentaire sur l'incidence du lymphome malin : une réduction de 25% de la ration alimentaire par rapport au groupe contrôle nourri *ad libidum* a été associée à une diminution significative du nombre de lymphomes après 25 mois (incidence de 5% contre 19% dans le groupe contrôle) (Volk *et al.*, 1994). Dans nos études, les souris sont nourries *ad libidum*, mais un projet de restriction alimentaire, à la fois calorique et protéique est en cours de réflexion. Cela permettrait une réduction de l'incidence des tumeurs et une augmentation de la durée de survie des animaux au cours des études de cancérogenèse.

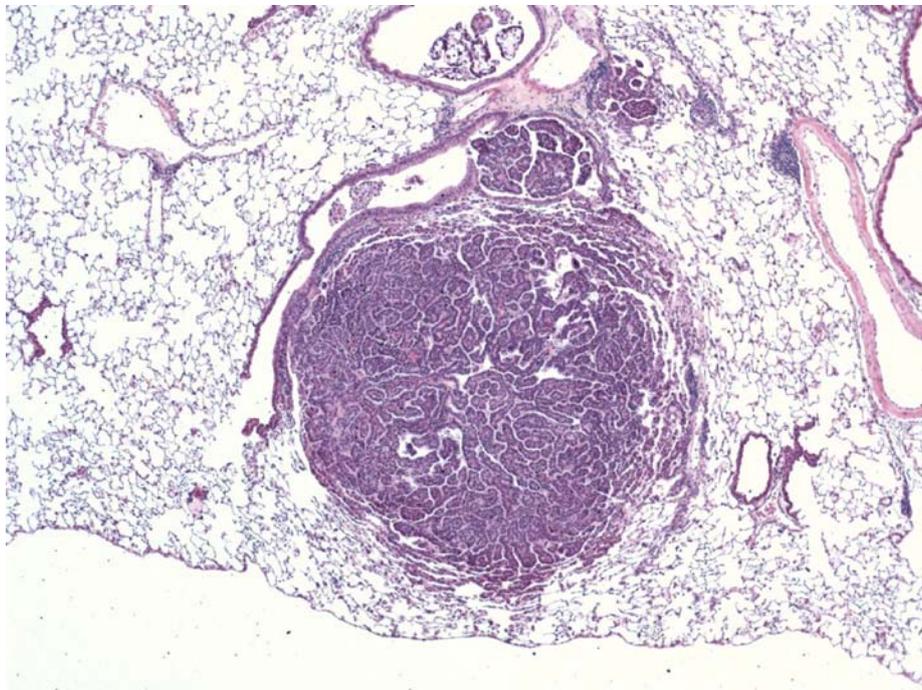
3) Adénome bronchiolo-alvéolaire du poumon

◆ Résultats

L'adénome bronchiolo-alvéolaire a été la seconde tumeur la plus observée chez les mâles (4.9%) et les troisième tumeur chez les femelles (3.2%).

Histologiquement, on a observé une tumeur bien délimitée avec une compression plus ou moins importante du parenchyme pulmonaire, composée de cellules cubiques à polygonales formant des cordons et des amas qui remplissaient les espaces alvéolaires (type solide) (**Figure 31**).

Figure 31 : Adénome bronchiolo-alvéolaire (poumon, HE, x4)



Parfois les cellules tumorales étaient supportées par un fin stroma fibro-vasculaire avec des projections dans les sacs alvéolaires (type papillaire). Certains adénomes étaient de type mixte, à la fois solides et papillaires. Les atypies cytologiques et l'index mitotique étaient très faibles. En périphérie de la tumeur, une accumulation de macrophages alvéolaires spumeux a parfois été observée.

◆ Discussion

Le diagnostic différentiel doit se faire avec l'hyperplasie bronchiolo-alvéolaire pour les petites lésions (absence de compression du parenchyme adjacent, pas d'oblitération des lumières alvéolaires par les cellules) et avec l'adénocarcinome bronchiolo-alvéolaire bien différencié pour les lésions plus étendues. Dans ce dernier cas, les critères de malignité sont un empilement des noyaux, une perte de polarité cellulaire, des atypies cytologiques et une invasion du parenchyme adjacent (Mohr *et al.*, 2001).

Les tumeurs primitives du poumon sont assez fréquentes chez les souris de laboratoire, avec une incidence variable selon les souches. La souche la plus susceptible est la souche A avec une incidence de plus de 80%. L'incidence rapportée pour la C57BL/6 est de 6.1% chez les mâles et de 2.8% chez les femelles, après 16 à 23 mois d'étude (Frith *et al.*, 1983). Ces résultats sont assez comparables à ce que nous avons observé avec une incidence plus forte chez les mâles que chez les femelles.

L'histogénèse des tumeurs primitives du poumon chez la souris a été largement étudiée. Il est généralement accepté que les adénomes bronchiolo-alvéolaires de type solide auraient pour origine les pneumocytes de type II alors que les tumeurs papillaires auraient pour origine soit les pneumocytes de type II, soit les cellules de Clara (Dixon et Maronpot, 1991).

4) Fibrosarcome sous-cutané

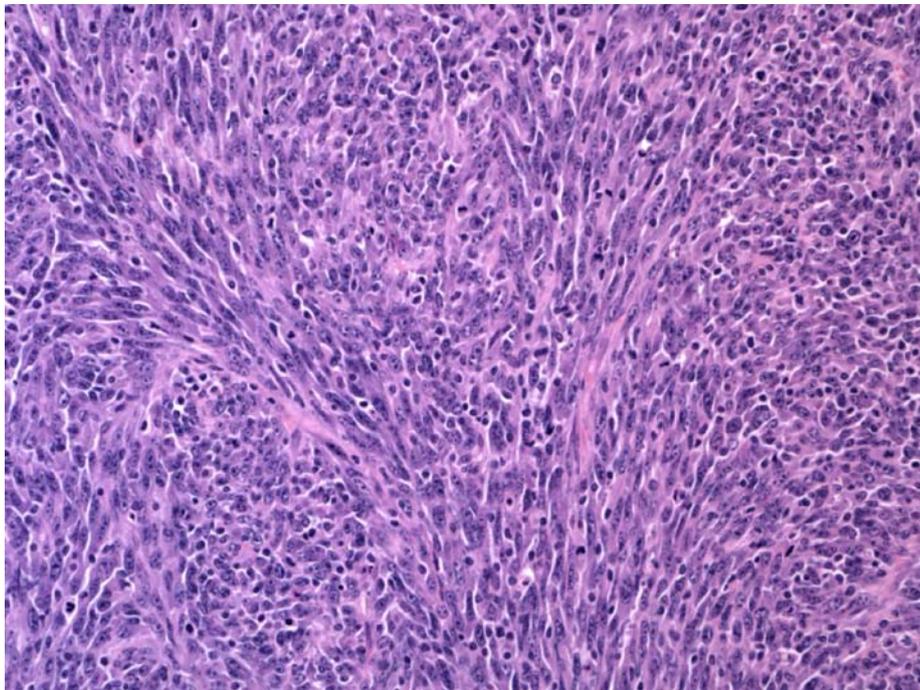
◆ Résultats

Le fibrosarcome sous-cutané a surtout été observé chez les femelles, pour lesquelles il a représenté la quatrième tumeur (2.6%). L'incidence chez les mâles a été beaucoup plus faible avec seulement 3/350 cas (0.9%).

Macroscopiquement, la tumeur a été prélevée sur le dos principalement, le thorax, l'abdomen et les membres. Une alopecie et/ou une ulcération de la peau en regard de la tumeur a été fréquemment observée. Pour les tumeurs prélevées au niveau du dos, on a parfois retrouvé la puce électronique d'identification au sein de la tumeur. La surface de coupe de la tumeur était blanchâtre à grisâtre, avec souvent une zone de nécrose centrale, parfois hémorragique.

Histologiquement, la tumeur a été caractérisée par une prolifération mal délimitée et infiltrante, de cellules fusiformes, avec une production plus ou moins abondante de collagène (**Figure 32**).

Figure 32: Fibrosarcome (tissu sous-cutané, HE, x20)



◆ Discussion

Les tumeurs mésoenchymateuses sous-cutanées sont assez fréquentes chez la souris de laboratoire. Chez la souris B6C3F1, l'incidence du fibrosarcome est de 3.1% chez les mâles et de 1.7% chez les femelles (Haseman *et al.*, 1999). Chez la souris C57BL/6, nous avons observé une plus forte incidence chez les femelles par rapport aux mâles.

Le diagnostic différentiel doit se faire avec le fibrome (tumeur bien délimitée, faible densité cellulaire et collagène abondant) et avec les autres tumeurs mésoenchymateuses malignes si la tumeur est peu différenciée (léiomyosarcome, liposarcome, mélanome achromique et schwannome malin). En présence d'une tumeur peu différenciée et en l'absence de marquage immuno-histochimique, le diagnostic de « sarcome à cellules fusiformes » est le plus approprié.

Une étude a récemment été publiée afin de mieux caractériser les tumeurs sous-cutanées associées à la présence de la puce électronique d'identification chez la souris B6C3F1 au cours des études de cancérogenèse (Le Calvez *et al.*, 2006). Sur les 52 tumeurs, différents diagnostics morphologiques ont été posés : 17 fibrosarcomes, 16 sarcomes à cellules fusiformes, 12 rhabdomyosarcomes, 3 fibrohistiocytes malins et 2 léiomyosarcomes. L'étude immunohistochimique et histochimique de ces tumeurs a montré un profil assez semblable, caractérisé par une immunohistochimie desmine +/-, actine +, myogénine -, protéine S100 -, anti-macrophages + et une coloration PTAH -. Ces résultats suggèrent que le diagnostic histologique le plus approprié pour ces tumeurs serait « sarcome d'origine non spécifié, avec une large composante myofibroblastique ».

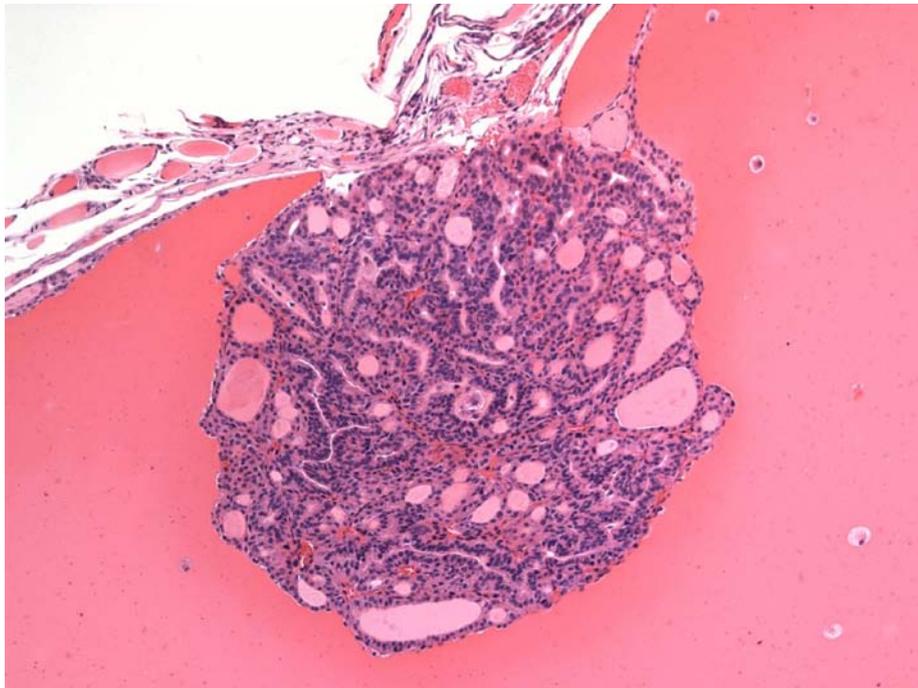
5) Adénome folliculaire thyroïdien

◆ Résultats

L'adénome folliculaire de la thyroïde a été observé chez 2.3% des femelles et a représenté la cinquième tumeur, et chez 0.6% des mâles seulement.

Histologiquement on a observé une lésion focale bien délimitée, non encapsulée, avec une compression plus ou moins importante des follicules adjacents, caractérisée par une prolifération de cellules épithéliales formant le plus souvent des papilles (type papillaire), des follicules (type folliculaire), ou un amas compact (type solide). La prolifération était souvent localisée au sein d'un follicule kystique (**Figure 33**).

Figure 33 : Adénome folliculaire kystique (glande thyroïde, HE, x4)



◆ Discussion

Les tumeurs de la thyroïde sont peu fréquentes chez la souris, et l'adénome folliculaire est la tumeur la plus fréquente, loin devant les tumeurs des cellules C (Jokinen et Botts, 1994). L'incidence est plus forte chez les femelles que chez les mâles, comme c'est le cas dans nos études. La tumeur peut être simple ou multiple, unilatérale ou bilatérale. Dans la plupart des cas, elle n'est pas détectée macroscopiquement.

Il existe un continuum morphologique entre l'hyperplasie, l'adénome et le carcinome folliculaire thyroïdien. C'est pourquoi le diagnostic différentiel entre les trois lésions n'est pas toujours aisé (Mohr *et al.*, 2001). La présence simultanée d'une compression (qui peut être présente en cas d'hyperplasie folliculaire focale kystique) et d'une prolifération cellulaire atypique permet de faire la différence avec une hyperplasie. La présence d'une invasion des tissus adjacents ou de métastases pose le diagnostic de carcinome folliculaire.

La progression entre hyperplasie et tumeur a été démontrée expérimentalement avec des traitements induisant une stimulation chronique des cellules folliculaires par la sécrétion de TSH par l'hypophyse (Capen et Martin, 1989). Il peut s'agir d'un effet direct par des substances goitrigènes qui inhibent la peroxydase responsable de l'incorporation de l'iode dans la thyroglobuline (par exemple le thiouracil). D'autres substances chimiques agissent indirectement, comme les inducteurs enzymatiques, hépatiques ou extra-hépatiques, qui sont responsables de la dégradation des hormones thyroïdiennes T3 et T4, et donc de la sécrétion de TSH par l'hypophyse.

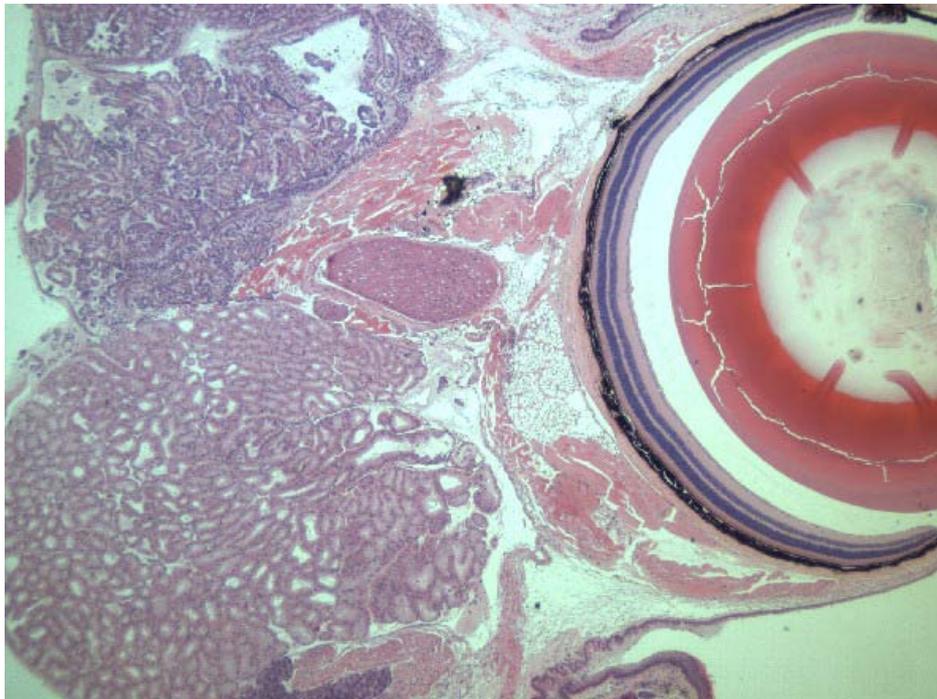
6) Adénome de la glande de Harder

◆ Résultats

L'adénome de la glande de Harder a été la troisième tumeur la plus observée chez les souris mâles C57BL/6 (2.3%). Elle a été observée chez 1.7% des femelles.

Histologiquement, on a observé une prolifération bien délimitée, non encapsulée avec une compression du parenchyme normal (**Figure 34**). Les cellules tumorales étaient cubiques à cylindriques et ressemblaient aux cellules normales, avec un cytoplasme éosinophile abondant finement vacuolisé et un noyau central ou basal. L'architecture était le plus souvent papillaire et parfois kystique. L'index mitotique était très faible.

Figure 34 : Adénome de la glande de Harder, en haut à gauche (glande de Harder et œil, HE, x2,5)



◆ Discussion

Chez la souris de laboratoire en général, la glande de Harder est l'un des trois organes à développer le plus de tumeurs avec le poumon et le foie (Krinke *et al.*, 1996). Les adénomes de la glande de Harder sont les tumeurs les plus fréquentes, souvent bilatérales, papillaires et kystiques. Elles apparaissent chez l'animal âgé et il existe un continuum en l'hyperplasie, la tumeur bénigne et la tumeur maligne. L'incidence est variable selon les souches : en général, l'incidence est plus forte chez les femelles que chez les mâles, sauf chez les mâles B6C3F1 et CD1 qui sont plus atteints que

les femelles. Chez la C57BL/6, l'incidence rapportée dans la littérature est de 3.4% chez les mâles et de 4.9% chez les femelles après 18 mois, ce qui est différent de ce que nous avons observé ici.

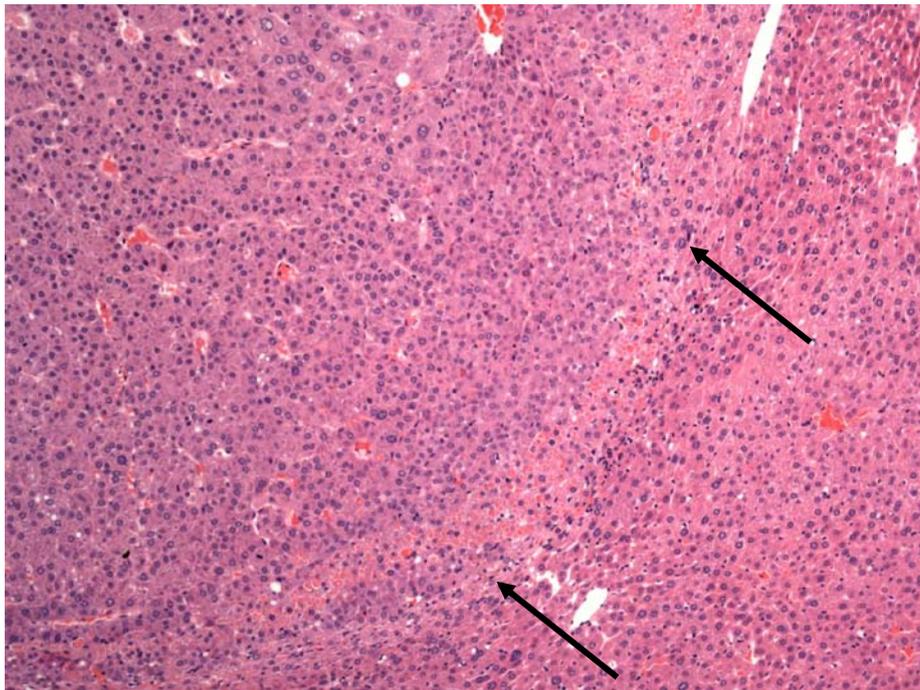
7) Adénome hépatocellulaire

◆ Résultats

L'adénome hépatocellulaire a été la quatrième tumeur observée chez les mâles (incidence de 1.7%). Il a été observé chez seulement 1.1% des femelles. La tumeur a souvent été détectée comme un nodule bien visible à l'autopsie.

Histologiquement, on a observé une prolifération bien délimitée, de taille supérieure à un lobule hépatique, avec une compression bien distincte du parenchyme hépatique adjacent (**Figure 35**). L'architecture lobulaire normale n'était pas conservée. Les cellules tumorales étaient uniformes, bien différenciées, avec une coloration du cytoplasme variable (éosinophile, basophile, claire ou mixte, parfois vacuolisé). Les travées hépatocytaires étaient régulières, composées le plus souvent d'une seule cellule, et souvent orientées perpendiculairement aux travées normales.

Figure 35 : Adénome hépatocellulaire (flèches) comprimant le parenchyme hépatique normal à droite (foie, HE, x20)



◆ Discussion

Les tumeurs du foie sont assez fréquentes chez la souris de laboratoire ; l'adénome et le carcinome hépatocellulaires arrivent en tête des incidences (Harada *et al.*, 1996). L'incidence augmente en général avec l'âge de l'animal ; elle plus forte chez les mâles que chez les femelles, ce que nous avons observé ici. L'incidence de l'adénome hépatocellulaire en particulier est très variable selon les souches : elle est forte chez les souris B6C3F1 et CD-1 alors qu'elle est plus faible chez la C57BL/6. C'est l'une des raisons pour lesquelles notre laboratoire a sélectionné cette souche.

Au sein d'une même souche, l'incidence est variable selon les facteurs suivants :

- nombre de souris par cage : l'incidence est plus forte chez les souris logées individuellement,
- alimentation : l'incidence est plus faible en cas de restriction protéique,
- présence d'un lymphome malin : l'incidence est plus forte chez les souris non porteuses d'un lymphome,
- fournisseur de la souche,
- durée de l'étude...

Le diagnostic différentiel doit être fait avec les foyers d'altération hépatocellulaire, considérés comme des lésions pré-tumorales (Mohr *et al.*, 2001). Les principaux critères en faveur du foyer d'altération sont : une compression absente ou minimale, une continuité entre les travées hépatocytaires et une architecture lobulaire maintenue. La taille de la lésion n'est pas un critère valable. Dans nos études, une bonne corrélation entre la présence des foyers d'altération hépatocellulaire (basophiles surtout) et celle des adénomes a été observée, avec une incidence plus forte des foyers chez les mâles, ce qui n'est pas forcément le cas dans les autres souches, comme la B6C3F1 (voir **Annexe 12**).

CONCLUSION

Ce travail avait pour but de faire la synthèse des lésions histopathologiques spontanées observées chez la souris C57BL/6 au cours de sept études de cancérogenèse. Il a également permis de comparer cette souche avec les deux souches les plus utilisées dans les études de toxicologie, à savoir la CD-1 et la B6C3F1.

Nous avons pu mettre en évidence un taux de survie élevé après 18 mois, compatible avec les données rapportées dans la bibliographie. La proportion d'animaux euthanasiés pour raison éthique a été beaucoup plus importante que celle des animaux trouvés morts dans les deux sexes. Parmi les causes d'euthanasie, la dermatite ulcéreuse chronique, entité spécifique des souris au pelage noir, a représenté de loin la cause la plus fréquente.

Parmi les lésions non tumorales, l'amyloïdose systémique a été l'affection la plus fréquente, même si son incidence a été très variable d'une étude à l'autre. Contrairement à ce qui a été décrit chez la souche CD-1, elle n'a pas représenté une cause de mort fréquente. Les autres lésions non tumorales fréquemment observées ont été des lésions caractéristiques de la souris âgée : dégénérescence, atrophie, kystes et de dépôts de pigment.

L'incidence globale des tumeurs a été assez faible comparée à celle rapportée dans d'autres souches comme la B6C3F1. Les lésions tumorales ont été plus fréquemment observées chez les femelles que chez les mâles et elles étaient plus souvent bénignes que malignes. L'adénome hypophysaire chez la femelle, le lymphome malin et l'adénome bronchiolo-alvéolaire du poumon ont été les trois tumeurs les plus fréquentes. Les tumeurs du foie, souvent rapportées chez les autres souches, ont ici été observées avec une incidence faible.

L'ensemble des observations rapportées dans ce travail constitue une banque de données historiques de la souris C57BL/6 au cours des études de cancérogenèse. Ces données historiques, très importantes dans l'interprétation des résultats, sont précieuses pour le laboratoire dans lequel elles ont été produites. Elles peuvent également servir de référence à d'autres laboratoires, mais dans ce cas les variations liées aux conditions d'expérience doivent être prises en compte.

La restriction alimentaire envisagée dans notre laboratoire pour la conduite des futures études de cancérogenèse est une décision délicate à prendre : si cette restriction entraînera une augmentation de la survie des animaux et une baisse de l'incidence des tumeurs, cela signifiera également la perte de toutes nos données historiques et impliquera donc de repartir à zéro...

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALBASSAM, M. A., WOJCINSKI, Z. W., BARSOUM, N. J. et SMITH, G. S. (1991). "Spontaneous fibro-osseous proliferative lesions in the sternums and femurs of B6C3F1 mice." *Vet Pathol* **28**(5): 381-388.

ANDREWS, A. G., DYSKO, R. C., SPILMAN, S. C., KUNKEL, R. G., BRAMMER, D. W. et JOHNSON, K. J. (1994). "Immune complex vasculitis with secondary ulcerative dermatitis in aged C57BL/6NNia mice." *Vet Pathol* **31**(3): 293-300.

BALL, C. R., CLOWER, B. R. et WILLIAMS, W. L. (1965). "Dietary-induced atrial thrombosis in mice." *Arch Pathol* **80**(4): 391-396.

CAPEN, C. C. et MARTIN, S. L. (1989). "The effects of xenobiotics on the structure and function of thyroid follicular and C-cells." *Toxicol Pathol* **17**(2): 266-293.

CARLTON, W. W. et ENGELHARDT, J. A. (1991). Atrial thrombosis, rat, mouse and hamster. *In: Monographs on pathology of laboratory animals: cardiovascular and musculoskeletal systems.* T. C. Jones, U. Mohr and R. D. Hunt. New York, Springer-Verlag: 37-41.

DAVIS, J., DIXON, D. et HERBERT, R. A. (1999). Ovary, oviduct, uterus, cervix and vagina. *In: Pathology of the mouse : reference and atlas.* R. R. Maronpot, G. A. Boorman and B. W. Gaul. Vienna, USA, Cache River Press: 409-443.

DIXON, D. et MARONPOT, R. R. (1991). "Histomorphologic features of spontaneous and chemically-induced pulmonary neoplasms in B6C3F1 mice and Fischer 344 rats." *Toxicol Pathol* **19**(4): 540-556.

ELWELL, M. R. et MAHLER, J. F. (1999). Heart, blood vessels and lymphatic vessels *In: Pathology of the mouse : reference and atlas.* R. R. Maronpot, G. A. Boorman and B. W. Gaul. Vienna, USA, Cache River Press: 371-380.

ENGELHARDT, J. A., GRIES, C. L. et LONG, G. G. (1993). "Incidence of spontaneous neoplastic and nonneoplastic lesions in Charles River CD-1 mice varies with breeding origin." *Toxicol Pathol* **21**(6): 538-541.

ETTLIN, R. A., STIRNIMANN, P. et PRENTICE, D. E. (1994). "Causes of death in rodent toxicity and carcinogenicity studies." *Toxicol Pathol* **22**(2): 165-178.

FACCINI, J. M., ABBOTT, D. P. et PAULUS, G. J. J. (1990). Cardiovascular system. *In: Mouse histopathology*. Elsevier Science Publishing. New York: 64-71.

FRAME, S. R. et SLONE, T. W. (1996). Non neoplastic and neoplastic changes in the eye. *In: Pathobiology of the aging mouse*. Mohr U., Dungworth D. L., Capen C. C., Carlton W. W., Sunberg J. P. and Ward J. M. Eds. Washington DC, ILSI Press. **2**: 98-100.

FRITH, C. H. et WILEY, L. D. (1981). "Morphologic classification and correlation of incidence of hyperplastic and neoplastic hematopoietic lesions in mice with age." *J Gerontol* **36**(5): 534-545.

FRITH, C. H., HIGHMAN, B., BURGER, G. et SHELDON, W. D. (1983). "Spontaneous lesions in virgin and retired breeder BALB/c and C57BL/6 mice." *Lab Anim Sci* **33**(3): 273-286.

FRITH, C. H. et WARD, J. M. (1988). Color atlas of neoplastic and non neoplastic lesions in aging mice. Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, Elsevier. 102 pp.

FRITH, C. H., WARD, J. M., FREDERICKSON, T. et HARLEMAN, J. (1996). Neoplastic lesions of the hematopoietic system. *In: Pathobiology of the aging mouse*. Mohr U., Dungworth D. L., Capen C. C., Carlton W. W., Sunberg J. P. and Ward J. M. Eds. Washington DC, ILSI Press. **1**: 219-235.

GERVAIS, F. et ATTIA, M. A. (2005). "Fibro-osseous proliferation in the sternums and femurs of female B6C3F1, C57black and CD-1 mice: a comparative study." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **112**(9): 323-326.

GIKNIS, M. et CLIFFORD, C.B. (2005). "Spontaneous neoplastic lesions in the Crl:CD-1 (ICR) mouse in control groups from 18 month to 2 year studies." [en-ligne] Charles River Laboratories.

(modifié en Mars 2005),

[<http://www.criver.com/frFR/ProdServ/ByType/ResModOver/ResMod/Pages/CD-1Mouse.aspx>]

(consulté le 12 Juin 2009).

GOPINATH, C., PRENTICE, D. E. et LEWIS, D. J. (1987). Atlas of experimental toxicological pathology. Boston, Blackwell Publishing Professional.122-136.

GUO, L., JOHNSON, R. S. et SCHUH, J. C. (2000). "Biochemical characterization of endogenously formed eosinophilic crystals in the lungs of mice." *J Biol Chem* **275**(11): 832-837.

HAILEY, J. R., HASEMAN, J. K., BUCHER, J. R., RADOVSKY, A. E., MALARKEY, D. E., MILLER, R. T., et al. (1998). "Impact of Helicobacter hepaticus infection in B6C3F1 mice from twelve National Toxicology Program two-year carcinogenesis studies." *Toxicol Pathol* **26**(5): 602-611.

HARADA, T., ENOMOTO, A., BOORMAN, G. A. et MARONPOT, R. R. (1999). Liver and gallbladder. *In: Pathology of the mouse : reference and atlas*. R. R. Maronpot, G. A. Boorman and B. W. Gaul. Vienna, USA, Cache River Press: 119-183.

HARADA, T. , MARONPOT, R. R., ENOMOTO, A., TAMANO, S. et WARD, J. M. (1996). Changes in the liver and gallbladder. *In: Pathobiology of the aging mouse*. Mohr U., Dungworth D. L., Capen C. C., Carlton W. W., Sunberg J. P. and Ward J. M. Eds. Washington DC, ILSI Press. **2**: 207-241.

HARD, G. C. et SNOWDEN, R. T. (1991). "Hyaline droplet accumulation in rodent kidney proximal tubules: an association with histiocytic sarcoma." *Toxicol Pathol* **19**(2): 88-97.

HASEMAN, J. K., HUFF, J. E., RAO, G. N. et EUSTIS, S. L. (1989). "Sources of variability in rodent carcinogenicity studies." *Fundam Appl Toxicol* **12**(4): 793-804.

HASEMAN, J. K., BOORMAN, G. A. et HUFF, J. (1997). "Value of historical control data and other issues related to the evaluation of long-term rodent carcinogenicity studies." *Toxicol Pathol* **25**(5): 524-7.

HASEMAN, J. K., ELWELL, M. R. et HAILEY, J. R. (1999). Neoplasm incidences in B6C3F1 mice: NTP historical data. *In: Pathology of the mouse : reference and atlas*. R. R. Maronpot, G. A. Boorman and B. W. Gaul. Vienna, USA, Cache River Press: 679-689.

HIGUCHI, K., NAIKI, H., KITAGAWA, K., HOSOKAWA, M. et TAKEDA, T. (1991). "Mouse senile amyloidosis. ASSAM amyloidosis in mice presents universally as a systemic age-associated amyloidosis." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **60**(4): 231-238.

HOENERHOFF, M. J., STAROST, M. F. et WARD, J. M. (2006). "Eosinophilic crystalline pneumonia as a major cause of death in 129S4/SvJae mice." *Vet Pathol* **43**(5): 682-688.

HOGENESCH, H. , GRUYS, E. et HIGUCHI, K. (1996). Senile amyloidosis. *In: Pathobiology of the aging mouse*. Mohr U., Dungworth D. L., Capen C. C., Carlton W. W., Sunberg J. P. and Ward J. M. Eds. Washington DC, ILSI Press. **1**: 237-243.

HORTON, C. E., DAVISSON, M. T., JACOBS, J. B., BERNSTEIN, G. T., RETIK, A. B. et MANDELL, J. (1988). "Congenital progressive hydronephrosis in mice: a new recessive mutation." *J Urol* **140**(5 Pt 2): 1310-1315.

JOKINEN, M. P. et BOTTS, S. (1994). Tumours of the thyroid gland. *In: Pathology of tumours in laboratory animals: Tumours of the mouse*. Turosov V. S. and Mohr U. Eds. Lyon, IARC Scientific publications. **2**: 565-594.

KLEVAY, L. M. (1985). "Atrial thrombosis, abnormal electrocardiograms and sudden death in mice due to copper deficiency." *Atherosclerosis* **54**(2): 213-224.

KRINKE, G., SCHAETTI, P. et KRINKE, A. L. (1996). Non neoplastic and neoplastic changes in the harderian and lacrimal glands. *In: Pathobiology of the aging mouse*. Mohr U., Dungworth D. L., Capen C. C., Carlton W. W., Sunberg J. P. and Ward J. M. Eds. Washington DC, ILSI Press. **2**: 139-151.

KULWICH, B. A. (1994). "Epidermoid cysts in the central nervous system of rats and mice: an incidental finding in toxicity/oncogenicity studies." *Vet Pathol* **31**(4): 475-478.

LAWSON, G. W., SATO, A., FAIRBANKS, L. A. et LAWSON, P. T. (2005). "Vitamin E as a treatment for ulcerative dermatitis in C57BL/6 mice and strains with a C57BL/6 background." *Contemp Top Lab Anim Sci* **44**(3): 18-21.

LE CALVEZ, S., PERRON-LEPAGE, M. F. et BURNETT, R. (2006). "Subcutaneous microchip-associated tumours in B6C3F1 mice: a retrospective study to attempt to determine their histogenesis." *Exp Toxicol Pathol* **57**(4): 255-265.

LEE, A. Y., CHUNG, S. K. et CHUNG, S. S. (1995). "Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7): 2780-2784.

LEININGER, J. R., MCDONALD, M. M. et ABBOTT, D. P. (1990). "Hepatocytes in the mouse stomach." *Toxicol Pathol* **18**(4 Pt 2): 678-686.

LEININGER, J. R., JOKINEN, M. P., DANGLER, C. A. et WHITELEY, L. O. (1999). Oral cavity, esophagus and stomach. In: Pathology of the mouse : reference and atlas. R. R. Maronpot, G. A. Boorman and B. W. Gaul. Vienna, USA, Cache River Press: 29-48.

LEWIS, D. J. (1984). "Spontaneous lesions of the mouse biliary tract." *J Comp Pathol* **94**(2): 263-271.

LIPMAN, R. D., GAILLARD, E. T., HARRISON, D. E. et BRONSON, R. T. (1993). "Husbandry factors and the prevalence of age-related amyloidosis in mice." *Lab Anim Sci* **43**(5): 439-444.

LONG, G. (2004). "Recommendations to guide determining cause of death in toxicity studies." *Toxicol Pathol* **32**(2): 269-270.

LONG, P. H. et LEININGER, J. R. (1999). Bones, joints, and synovia. In: Pathology of the mouse : reference and atlas. R. R. Maronpot, G. A. Boorman and B. W. Gaul. Vienna, USA, Cache River Press: 645-678.

MAHLER, J. F. et ELWELL, M. R. (1999). Pituitary gland. *In: Pathology of the mouse : reference and atlas*. R. R. Maronpot, G. A. Boorman and B. W. Gaul. Vienna, USA, Cache River Press: 491-507.

MAITA, K., HIRANO, M., HARADA, T., MITSUMORI, K., YOSHIDA, A., TAKAHASHI, K., et al. (1988). "Mortality, major cause of moribundity, and spontaneous tumors in CD-1 mice." *Toxicol Pathol* **16**(3): 340-349.

MEYERHOLZ, D. K. et HOSTETTER, S. J. (2005). "Unilateral perinephric pseudocyst secondary to hydronephrosis in a C57BL/6J mouse." *Vet Pathol* **42**(4): 496-498.

MOHR, U., CAPEN, C. C., DUNGWORTH, D. L., GREAVES, P., HARDISTY, J. F., HAYASHI, Y., et al. (2001). International classification of rodent tumors: the mouse. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag. 474 pages.

MORAWIETZ, G., RITTINGHAUSEN, S. et MOHR, U. (1992). "RITA--Registry of Industrial Toxicology Animal-data--progress of the working group." *Exp Toxicol Pathol* **44**(6): 301-309.

MORGAN, K. T., JOHNSON, B. P., FRITH, C. H. et TOWNSEND, J. (1982). "An ultrastructural study of spontaneous mineralization in the brains of aging mice." *Acta Neuropathol* **58**(2): 120-124.

MURRAY, A. B. et LUZ, A. (1990). "Acidophilic macrophage pneumonia in laboratory mice." *Vet Pathol* **27**(4): 274-281.

NYSKA, A. et MARONPOT, R. R. (1999). Adrenal gland. *In: Pathology of the mouse : reference and atlas*. R. R. Maronpot, G. A. Boorman and B. W. Gaul. Vienna, USA, Cache River Press: 509-536.

OCDE. (1981). "Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques N°451 du 12/05/81: Etude de cancérogénèse " [en-ligne],
[<http://titania.sourceoecd.org/vl=2656645/cl=11/nw=1/lg=fre/rpsv/cgibin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oe cdjournals/16843681/v1n4/s36/p1.idx>] (consulté le 17 Mai 2009).

PATTENGALE, P. K. et FRITH, C. H. (1983). "Immunomorphologic classification of spontaneous lymphoid cell neoplasms occurring in female BALB/c mice." *J Natl Cancer Inst* **70**(1): 169-179.

PERCY, D. H. et BARTHOLD, S. W. (2007). Pathology of laboratory rodents and rabbits. Ames, Blackwell Publishing Professional. 256 pages.

PETO, R., PIKE, M. C., ARMITAGE, P., BRESLOW, N. E., COX, D. R., HOWARD, S. V., et al. (1980). "Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments." *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*: 311-426.

PLENDL, J. , KOLLE, S., SINOWATZ, F. et SCHWMAHL, W. (1996). Non neoplastic lesions in blood vessels. *In: Pathobiology of the aging mouse*. Dungworth D. L. Mohr U., Capen C. C , Carlton W. W., Sunberg J. P. and Ward J. M. Eds. Washington DC, ILSI Press. **2**: 361-372.

PRICE, P. et PAPANIMITRIOU, J. M. (1996). Genetic and immunologic determinants of age-related and virus-induced cardiopathy. *In: Pathobiology of the aging mouse*. Mohr U., Dungworth D. L., Capen C. C., Carlton W. W., Sunberg J. P. and Ward J. M. Eds. Washington DC, ILSI Press. **1**: 373-383.

RABSTEIN, L. S., PETERS, R. L. et SPAHN, G. J. (1973). "Spontaneous tumors and pathologic lesions in SWR-J mice." *J Natl Cancer Inst* **50**(3): 751-758.

RAO, G. N. (1999). Growth, body weight patterns and life span of the B6C3F1 mouse. *In: Pathology of the mouse : reference and atlas*. R. R. Maronpot, G. A. Boorman and B. W. Gaul. Vienna, USA, Cache River Press: 7-11.

RILEY, L. K., FRANKLIN, C. L., HOOK, R. R. et BESCH-WILLIFORD, C. (1996). "Identification of murine helicobacters by PCR and restriction enzyme analyses." *J Clin Microbiol* **34**(4): 942-946.

SEELY, J. C. (1999). Kidney. *In: Pathology of the mouse : reference and atlas*. R. R. Maronpot, G. A. Boorman and B. W. Gaul. Vienna, USA, Cache River Press: 208-234.

SILBERBERG, M. et SILBERBERG, R. (1970). "Age-linked modification of the effect of estrogen on joints and cortical bone of female mice." *Gerontologia* **16**(4): 201-211.

SUNDBERG, J. P., BROWN, K. S. et MCMAHON, W. N. (1994). Chronic ulcerative dermatitis in black mice. *In: Handbook of mouse mutations with skin and hair abnormalities: animal models and biochemical tools*. J. P. Sundberg. Boca Raton, FL, CRC Press: 485-492.

SUNDBERG, J. P., BETH, A. S. et KING, L. E. (1996). Cutaneous changes in commonly used inbred mouse strains and mutant stocks. *In: Pathobiology of the aging mouse*. Mohr U., Dungworth D. L., Capen C. C., Carlton W. W., Sunberg J. P. and Ward J. M. Eds. Washington DC, ILSI Press. **2**: 330-333.

SUTTIE, A. W. (2006). "Histopathology of the spleen." *Toxicol Pathol* **34**(5): 466-503.

THE JACKSON LABORATORY. (1989). "Splenic melanosis in black mice." [en-ligne], [<http://jaxmice.jax.org/jaxnotes/archive/439c.html>] (consulté le 11 Juin 2009).

THE JACKSON LABORATORY. (2003). "Hydrocephalus in laboratory mice." [en-ligne], [<http://jaxmice.jax.org/jaxnotes/archive/490f.html>] (consulté le 15 Juin 2009).

THE JACKSON LABORATORY. (2008). "Jax mice database." [en-ligne], [<http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>] (consulté le 13 Juin 2009).

VOLK, M. J., PUGH, T. D., KIM, M., FRITH, C. H., DAYNES, R. A., ERSHLER, W. B., et al. (1994). "Dietary restriction from middle age attenuates age-associated lymphoma development and interleukin 6 dysregulation in C57BL/6 mice." *Cancer Res* **54**(11): 3054-3061.

VOLKER, G. et YOSHITOMI, K. (1999). Eyes. *In: Pathology of the mouse : reference and atlas*. R. R. Maronpot, G. A. Boorman and B. W. Gaul. Vienna, USA, Cache River Press: 471-490.

WARD, J. M., GOODMAN, D. G., SQUIRE, R. A., CHU, K. C. et LINHART, M. S. (1979). "Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging (C57BL/6N x C3H/HeN)F1 (B6C3F1) mice." *J Natl Cancer Inst* **63**(3): 849-854.

WARD, J. M., ANVER, M. R., HAINES, D. C. et BENVENISTE, R. E. (1994a). "Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*." *Am J Pathol* **145**(4): 959-968.

WARD, J. M., FOX, J. G., ANVER, M. R., HAINES, D. C., GEORGE, C. V., COLLINS, M. J., et al. (1994b). "Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species." *J Natl Cancer Inst* **86**(16): 1222-1227.

WARD, J. M., MANN, P. C., MORISHIMA, H. et FRITH, C. H. (1999). Thymus, spleen and lymph nodes. *In: Pathology of the mouse : reference and atlas*. R. R. Maronpot, G. A. Boorman and B. W. Gaul. Vienna, USA, Cache River Press: 333-360.

WATANABE, Y. G. (1991). "The occurrence and developmental origin of epithelial cysts in the rat and mouse adenohypophysis." *Arch Histol Cytol* **54**(5): 511-518.

WATERSTON, R. H., LINDBLAD-TOH, K., BIRNEY, E., ROGERS, J., ABRIL, J. F., AGARWAL, P., et al. (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." *Nature* **420**(6915): 520-562.

WOLF, D. C., TUREK, J. J. et CARLTON, W. W. (1992). "Early sequential ultrastructural renal alterations induced by 2-bromoethylamine hydrobromide in the Swiss ICR mouse." *Vet Pathol* **29**(6): 528-535.

YANG, Y. H. et CAMPBELL, J. S. (1964). "Crystalline Excrements in Bronchitis and Cholecystitis of Mice." *Am J Pathol* **45**: 337-345.

YOSHITOMI, K. et BOORMAN, G. A. (1994). Tumours of the gallbladder. *In: Pathology of tumours in laboratory animals: Tumours of the mouse*. Turosov V. S. and Mohr U. Eds. Lyon, IARC Scientific publications. **2**: 271-279.

YOSHIZAWA, K., KISSLING, G. E., JOHNSON, J. A., CLAYTON, N. P., FLAGLER, N. D. et NYSKA, A. (2005). "Chemical-induced atrial thrombosis in NTP rodent studies." *Toxicol Pathol* **33**(5): 517-532.

ANNEXES

**Annexe 1 : Taux de survie des mâles en fonction du temps au cours des 7 études de
cancérogène**

<i>Etude</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>TOTAL</i>	<i>Range (%)</i>
<i>Nombre total d'animaux</i>	50	50	50	50	50	50	50	350	-
<i>Nombre d'animaux survivants après 26 semaines (% survie après 26 semaines)</i>	50 (100%)	49 (98%)	48 (96%)	50 (100%)	49 (98%)	50 (100%)	49 (98%)	345 (98.6%)	96-100
<i>Nombre d'animaux survivants après 52 semaines (% survie après 52 semaines)</i>	49 (98%)	47 (94%)	48 (96%)	48 (96%)	47 (94%)	48 (96%)	48 (96%)	335 (95.7%)	94-98
<i>Nombre d'animaux survivants après 65 semaines (% survie après 65 semaines)</i>	49 (98%)	44 (88%)	48 (96%)	45 (90%)	46 (92%)	46 (92%)	48 (96%)	326 (93.1%)	88-98
<i>Nombre d'animaux survivants après 78 semaines (% survie après 78 semaines)</i>	45 (90%)	41 (82%)	43 (86%)	39 (78%)	38 (76%)	42 (84%)	38 (76%)	286 (81.7%)	76-90

Annexe 2 : Taux de survie des femelles en fonction du temps au cours des 7 études de cancérogénèse

<i>Etude</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>TOTAL</i>	<i>Range (%)</i>
<i>Nombre total d'animaux</i>	50	50	50	50	50	50	50	350	-
<i>Nombre d'animaux survivants après 26 semaines (% survie après 26 semaines)</i>	48 (96%)	50 (100%)	47 (94%)	50 (100%)	49 (98%)	48 (96%)	49 (98%)	341 (97.4%)	94-100
<i>Nombre d'animaux survivants après 52 semaines (% survie après 52 semaines)</i>	47 (94%)	50 (100%)	45 (90%)	47 (94%)	44 (88%)	46 (92%)	48 (96%)	327 (93.4%)	88-100
<i>Nombre d'animaux survivants après 65 semaines (% survie après 65 semaines)</i>	47 (94%)	49 (98%)	42 (84%)	45 (90%)	44 (88%)	43 (86%)	48 (96%)	318 (90.9%)	84-98
<i>Nombre d'animaux survivants après 78 semaines (% survie après 78 semaines)</i>	44 (88%)	46 (92%)	35 (70%)	44 (88%)	40 (80%)	40 (80%)	44 (88%)	293 (83.7%)	70-92

**Annexe 3 : Données individuelles concernant la mortalité des mâles au cours des 7 études de
cancérogénèse**

<i>N° étude</i>	<i>N° animal</i>	<i>Statut mortalité</i>	<i>Date de mort (semaine)</i>	<i>Cause de mort/euthanasie</i>
Etude A	3319	Euthanasié	50	Tumeur sous-cutanée (fibrosarcome)
	3305	Euthanasié	67	Mauvais état général
	3304	Trouvé mort	67	Non déterminée
	3275	Trouvé mort	71	Non déterminée
	3288	Trouvé mort	71	Non déterminée
Etude B	1581	Euthanasié	16	Dermatite ulcéreuse
	1585	Euthanasié	35	Dermatite ulcéreuse
	1582	Euthanasié	38	Artérite/préartérite
	1609	Euthanasié	52	Dermatite ulcéreuse
	1574	Euthanasié	52	Mauvais état général
	1610	Euthanasié	58	Tumeur sous-cutanée (fibrosarcome)
	1573	Trouvé mort	70	Non déterminée
	1570	Euthanasié	77	Péritonite
	1613	Trouvé mort	78	Thrombose atriale
Etude C	2774	Euthanasié	20	Dermatite ulcéreuse
	2765	Euthanasié	22	Dermatite ulcéreuse
	2793	Euthanasié	67	Mauvais état général
	2788	Trouvé mort	68	Gastrite
	2813	Euthanasié	75	Artérite/préartérite
	2803	Trouvé mort	77	Hémangiosarcome (rate)
	2809	Euthanasié	78	Dermatite ulcéreuse

<i>N° étude</i>	<i>N° animal</i>	<i>Statut mortalité</i>	<i>Date de mort (semaine)</i>	<i>Cause de mort/euthanasie</i>
Etude D	1263	Trouvé mort	37	Non déterminée
	1277	Euthanasié	46	Abcès des glandes préputiales
	1297	Euthanasié	52	Dermatite ulcéreuse
	1274	Euthanasié	53	Tumeur sous-cutanée (fibrosarcome)
	1280	Euthanasié	59	Mauvais état général
	1310	Trouvé mort	67	Cardiomyopathie
	1273	Trouvé mort	69	Tumeur hématopoïétique (sarcome histiocytaire)
	1278	Trouvé mort	71	Non déterminée
	1262	Trouvé mort	74	Thrombose atriale
	1282	Trouvé mort	76	Amyloïdose
	1298	Euthanasié	77	Mauvais état général
Etude E	651	Euthanasié	3	Hydrocéphalie
	636	Euthanasié	40	Mauvais état général
	647	Euthanasié	51	Dermatite ulcéreuse
	653	Euthanasié	65	Non déterminée
	655	Trouvé mort	65	Thrombose atriale
	642	Trouvé mort	66	Non déterminée
	635	Trouvé mort	67	Non déterminée
	669	Euthanasié	70	Dermatite ulcéreuse
	656	Trouvé mort	73	Non déterminée
	626	Trouvé mort	78	Non déterminée
	644	Trouvé mort	78	Non déterminée
	639	Trouvé mort	79	Amyloïdose
Etude F	3250	Euthanasié	27	Dermatite ulcéreuse
	3221	Trouvé mort	44	Phéochromocytome
	3212	Euthanasié	50	Tumeur hématopoïétique (lymphome)
	3240	Euthanasié	61	Dermatite ulcéreuse
	3210	Trouvé mort	73	Non déterminée
	3228	Euthanasié	75	Inflammation pyogranulomateuse sous-cutanée
	3225	Trouvé mort	76	Non déterminée
	3216	Euthanasié	78	Hémorragie

<i>N° étude</i>	<i>N° animal</i>	<i>Statut mortalité</i>	<i>Date de mort (semaine)</i>	<i>Cause de mort/euthanasie</i>
Etude G	7316	Euthanasié	26	Mauvais état général
	7313	Euthanasié	36	Dermatite ulcéreuse
	7280	Trouvé mort	66	Non déterminée
	7309	Euthanasié	68	Dermatite ulcéreuse
	7286	Trouvé mort	71	Non déterminée
	7310	Euthanasié	73	Mauvais état général
	7304	Trouvé mort	74	Cardiomyopathie
	7292	Trouvé mort	74	Non déterminée
	7284	Trouvé mort	76	Non déterminée
	7290	Euthanasié	78	Tumeur hématopoïétique (lymphome)
	7276	Trouvé mort	79	Non déterminée
	7291	Trouvé mort	80	Non déterminée

**Annexe 4 : Données individuelles concernant la mortalité des femelles au cours des 7 études de
cancérogénèse**

<i>N° étude</i>	<i>N° animal</i>	<i>Statut mortalité</i>	<i>Date de mort (semaine)</i>	<i>Cause de mort/euthanasie</i>
Etude A	3377	Euthanasié	14	Dermatite ulcéreuse
	3348	Euthanasié	16	Non déterminée
	3365	Euthanasié	40	Tumeur sous-cutanée (fibrosarcome)
	3367	Euthanasié	67	Tumeur hématopoïétique (lymphome)
	3337	Euthanasié	73	Tumeur cutanée (folliculaire bénigne)
	3380	Euthanasié	82	Tumeur sous-cutanée (fibrosarcome)
Etude B	1640	Trouvé mort	53	Tumeur sous-cutanée (fibrosarcome)
	1659	Euthanasié	70	Septicémie
	1657	Trouvé mort	72	Tumeur sous-cutanée (fibrosarcome)
	1671	Trouvé mort	78	Non déterminée
Etude C	2871	Trouvé mort	7	Non déterminée
	2831	Euthanasié	22	Dermatite ulcéreuse
	2846	Euthanasié	22	Dermatite ulcéreuse
	2868	Euthanasié	43	Tumeur sous-cutanée (sarcome)
	2825	Euthanasié	50	Mauvais état général
	2862	Euthanasié	53	Artérite/préartérite
	2828	Euthanasié	55	Tumeur sous-cutanée (fibrosarcome)
	2867	Euthanasié	56	Dermatite ulcéreuse
	2870	Euthanasié	65	Tumeur hématopoïétique (lymphome)
	2854	Euthanasié	68	Thrombose atriale
	2838	Euthanasié	71	Non déterminée
	2858	Euthanasié	73	Néphropathie chronique
	2872	Euthanasié	73	Tumeur sous-cutanée (sarcome)
	2856	Euthanasié	78	Tumeur glande salivaire
2866	Euthanasié	80	Tumeur hématopoïétique (lymphome)	

<i>N° étude</i>	<i>N° animal</i>	<i>Statut mortalité</i>	<i>Date de mort (semaine)</i>	<i>Cause de mort/euthanasie</i>
Etude D	1331	Euthanasié	44	Mauvais état général
	1352	Euthanasié	48	Mauvais état général
	1343	Euthanasié	49	Dermatite ulcéreuse
	1356	Euthanasié	54	Mauvais état général
	1363	Euthanasié	54	Tumeur sous-cutanée (fibrosarcome)
	1362	Euthanasié	77	Tumeur cutanée (carcinome basocellulaire)
	689	Euthanasié	19	Dermatite ulcéreuse
Etude E	700	Euthanasié	43	Dermatite ulcéreuse
	730	Euthanasié	44	Inflammation pyogranulomateuse sous-cutanée
	723	Euthanasié	45	Mauvais état général
	701	Euthanasié	50	Dermatite ulcéreuse
	726	Euthanasié	51	Mauvais état général
	719	Trouvé mort	70	Tumeur hématopoïétique (lymphome)
	718	Euthanasié	73	Tumeur sous-cutanée (sarcome)
	717	Trouvé mort	75	Tumeur digestive
	721	Trouvé mort	77	Tumeur hématopoïétique (lymphome)
Etude F	3266	Euthanasié	13	Dermatite ulcéreuse
	3263	Euthanasié	26	Dermatite ulcéreuse
	3310	Euthanasié	27	Dermatite ulcéreuse
	3295	Euthanasié	36	Dermatite ulcéreuse
	3290	Euthanasié	56	Mauvais état général
	3285	Euthanasié	58	Dermatite ulcéreuse
	3291	Euthanasié	64	Dermatite ulcéreuse
	3309	Euthanasié	66	Tumeur hématopoïétique (lymphome)
	3305	Trouvé mort	78	Non déterminée
	3308	Accident	78	Trauma
Etude G	7335	Euthanasié	21	Dermatite ulcéreuse
	7336	Euthanasié	34	Dermatite ulcéreuse
	7373	Euthanasié	73	Tumeur sous-cutanée (sarcome)
	7341	Trouvé mort	76	Non déterminée
	7376	Euthanasié	76	Tumeur sous-cutanée (fibrosarcome)
	7365	Euthanasié	77	Mauvais état général

Annexe 5 : Incidence des causes de mort non tumorales

(% par rapport au nombre total de morts)

<i>Causes de mort non tumorales</i>	<i>Mâles</i>	<i>Femelles</i>
<i>Abcès des glandes préputiales</i>	1 (2%)	0
<i>Amyloïdose</i>	2 (3%)	0
<i>Artérite/préartérite</i>	2 (3%)	1 (2%)
<i>Cardiomyopathie</i>	2 (3%)	0
<i>Dermatite ulcéreuse</i>	13 (20%)	16 (28%)
<i>Gastrite</i>	1 (2%)	0
<i>Hémorragie</i>	1 (2%)	0
<i>Hydrocéphalie</i>	1 (2%)	0
<i>Inflammation pyogranulomateuse sous-cutanée</i>	1 (2%)	1 (2%)
<i>Mauvais état général</i>	8 (13%)	8 (14%)
<i>Péritonite</i>	1 (2%)	0
<i>Septicémie</i>	0	1 (2%)
<i>Thrombose atriale</i>	3 (5%)	1 (2%)
<i>Trauma</i>	0	1 (2%)
<i>Nombre total d'animaux morts avant la fin de l'étude</i>	64	57

Annexe 6 : Incidence des causes de mort tumorales

(% par rapport au nombre total de morts)

<i>Causes de mort tumorales</i>	<i>Males</i>	<i>Femelles</i>
<i>Carcinome basocellulaire cutané</i>	0	1 (2%)
<i>Fibrosarcome sous-cutané</i>	3 (5%)	7 (12%)
<i>Hémangiosarcome (rate)</i>	1 (2%)	0
<i>Lymphome malin multicentrique</i>	2 (3%)	6 (11%)
<i>Phéochromocytome de la médullosurrénale</i>	1 (2%)	0
<i>Sarcome histiocytaire</i>	1 (2%)	0
<i>Sarcome sous-cutané</i>	0	4 (7%)
<i>Tumeur digestive bénigne</i>	0	1 (2%)
<i>Tumeur folliculaire bénigne ovarienne</i>	0	1 (2%)
<i>Tumeur maligne des glandes salivaires</i>	0	1 (2%)
<i>Nombre total d'animaux morts avant la fin de l'étude</i>	64	57

Annexe 7 : Récapitulatif des souris mâles ayant une ou plusieurs tumeurs, bénignes ou malignes

<i>Etude</i>	<i>Etude A</i>	<i>Etude B</i>	<i>Etude C</i>	<i>Etude D</i>	<i>Etude E</i>	<i>Etude F</i>	<i>Etude G</i>	<i>RANGE</i>	<i>TOTAL</i>
Nombre d'animaux (mâles)	50	50	50	50	50	50	50	-	350
NOMBRE DE TUMEURS	3	11	11	6	17	15	15	3-17	78
Nombre d'animaux avec une ou plusieurs tumeurs	3	10	10	6	15	10	12	3-15	66
% d'animaux avec une ou plusieurs tumeurs	6%	20%	20%	12%	30%	20%	24%	6-30%	19%
NOMBRE DE TUMEURS BENIGNES	2	5	8	3	16	10	10	2-16	54
Nombre d'animaux avec une ou plusieurs tumeurs	2	5	8	3	15	7	8	2-15	48
% d'animaux avec une ou plusieurs tumeurs	4%	10%	16%	6%	30%	14%	16%	4-30%	14%
NOMBRE DE TUMEURS MALIGNES	1	6	3	3	1	5	5	1-6	24
Nombre d'animaux avec une ou plusieurs tumeurs	1	6	3	3	1	5	5	1-6	24
% d'animaux avec une ou plusieurs tumeurs	2%	12%	6%	6%	2%	10%	10%	2-12%	7%

Annexe 8 : Récapitulatif des souris femelles ayant une ou plusieurs tumeurs, bénignes ou malignes

<i>Etude</i>	<i>Etude 1</i>	<i>Etude 2</i>	<i>Etude 3</i>	<i>Etude 4</i>	<i>Etude 5</i>	<i>Etude 6</i>	<i>Etude 7</i>	<i>RANGE</i>	<i>TOTAL</i>
Nombre d'animaux (femelles)	50	50	50	50	50	50	50	-	350
NOMBRE DE TUMEURS	22	21	29	21	24	27	43	21-43	187
Nombre d'animaux avec une ou plusieurs tumeurs	19	17	22	17	21	19	33	17-33	148
% d'animaux avec une ou plusieurs tumeurs	38%	34%	44%	34%	42%	38%	66%	34-66%	42%
NOMBRE DE TUMEURS BENIGNES	17	16	21	11	17	22	28	11-28	132
Nombre d'animaux avec une ou plusieurs tumeurs	16	12	16	9	14	16	26	9-26	109
% d'animaux avec une ou plusieurs tumeurs	32%	24%	32%	18%	28%	32%	52%	18-52	31%
NOMBRE DE TUMEURS MALIGNES	5	5	8	10	7	5	15	5-15	55
Nombre d'animaux avec une ou plusieurs tumeurs	5	5	8	10	7	5	15	5-15	55
% d'animaux avec une ou plusieurs tumeurs	10%	10%	16%	20%	14%	10%	30%	10-30%	16%

Annexe 9 : Incidence des lésions tumorales observées chez la souris C57BL/6 au cours des 7 études de cancérogénèse

Organe/Tumeur	Mâles			Femelles		
	Incidence	%	Min-Max (%)	Incidence	%	Min-Max (%)
Système endocrin						
Hypophyse						
<i>Adénome de la Pars distalis</i>	0/334	0	0	79/343	23.0	8-42
<i>Adénome de la Pars intermedia</i>	0/334	0	0	1/343	0.3	0-2
Glande parathyroïde						
<i>Adénome</i>	1/296	0.3	0-2	0/305	0	0
Glande surrénale						
<i>Adénome cortical</i>	2/344	0.6	0-2	0/348	0	0
<i>Phéochromocytome</i>	3/344	0.9	0-2	1/348	0.3	0-2
<i>Adénome sous-capsulaire</i>	1/344	0.3	0-2	0/348	0	0
Glande thyroïde						
<i>Adénome folliculaire</i>	2/345	0.6	0-2	8/346	2.3	0-6
<i>Adénome des cellules C</i>	0/345	0	0	1/346	0.3	0-2
Pancréas endocrine						
<i>Adénome des îlots de Langerhans</i>	1/345	0.3	0-2	0/350	0	0
Système digestif						
Duodénum						
<i>Adénome</i>	1/335	0.3	0-2	1/348	0.3	0-2
Foie						
<i>Adénome hépatocellulaire</i>	6/348	1.7	0-8	4/350	1.1	0-4
<i>Hémangiome</i>	3/348	0.9	0-4	2/350	0.6	0-2
Glande salivaire						
<i>Tumeur mixte maligne</i>	0/349	0	0	1/349	0.3	0-2
Iléum						
<i>Adénome</i>	1/341	0.3	0-2	0/346	0	0
Vésicule biliaire						
<i>Adénome</i>	1/325	0.3	0-2	0/341	0	0
Système hématolymphopoïétique						
<i>Lymphome malin</i>	17/350	4.9	0-10	34/350	9.7	4-24
<i>Sarcome histiocytaire</i>	2/350	0.6	0-2	5/350	1.4	0-4
<i>Mastocytome</i>	0/350	0	0	1/350	0.3	0-2
Rate						
<i>Hémangiome</i>	1/343	0.3	0-2	0/349	0	0
<i>Hémangiosarcome</i>	1/343	0.3	0-2	0/349	0	0
Thymus						
<i>Thymome bénin</i>	1/325	0.3	0-2	0/341	0	0

Organe/Tumeur	Mâles			Femelles		
	Incidence	%	Min-Max (%)	Incidence	%	Min-Max (%)
Système reproducteur						
Ovaire						
<i>Lutéome bénin</i>				2/349	0.6	0-4
<i>Hémangiome</i>				2/349	0.6	0-2
<i>Tumeur bénigne des cellules de la granulosa</i>				1/349	0.3	0-2
Prostate						
<i>Papillome</i>	1/344	0.3	0-2			
Testicule						
<i>Leydigome bénin</i>	1/349	0.3	0-2			
Utérus						
<i>Polype stromal endométrial</i>				3/349	0.9	0-2
<i>Polype glandulaire</i>				1/349	0.3	0-2
<i>Adénome</i>				1/349	0.3	0-2
<i>Hémangiome</i>				2/349	0.6	0-2
Système circulatoire						
Tous sites						
<i>Hémangiome</i>	4/350	1.1	0-4	6/350	1.7	0-2
<i>Hémangiosarcome</i>	1/350	0.3	0-2	0/350	0	0
Divers						
Glande de Harder						
<i>Adénome</i>	8/350	2.3	0-4	6/350	1.7	0-4
Moelle épinière						
<i>Sarcome à cellules fusiformes</i>	0/350	0	0	1/349	0.3	0-2
Peau						
<i>Tumeur folliculaire bénigne</i>	0/342	0	0	1/341	0.3	0-2
<i>Carcinome basocellulaire</i>	0/342	0	0	1/341	0.3	0-2
Poumon						
<i>Adénome bronchiolo-alvéolaire</i>	17/349	4.9	0-16	11/349	3.2	0-6
<i>Adénocarcinome bronchiolo-alvéolaire</i>	1/349	0.3	0-2	0/349	0	0
Tissu sous-cutané						
<i>Fibrosarcome</i>	3/350	0.9	0-2	9/350	2.6	0-4
<i>Sarcome à cellules fusiformes</i>	0/350	0	0	3/350	0.9	0-4

**Annexe 10 : Incidence des tumeurs observées chez la souris B6C3F1 au cours de 27 études de
cancérogénèse de la NTP (d'après Haseman *et al.*, 1999)**

Organe/Tumeur	Mâles			Femelles		
	Incidence	%	Min- Max (%)	Incidence	%	Min- Max (%)
Système endocrin						
Hypophyse						
<i>Adénome de la Pars distalis</i>	5/1265	0.4	0-6	185/1290	14.3	0-36
<i>Adénome de la Pars intermedia</i>	3/1265	0.2	0-2	7/1290	0.5	0-2
Glande parathyroïde						
<i>Adénome</i>	0/1157	0	-	0/1134	0	-
Glande surrénale						
<i>Adénome cortical</i>	46/1335	3.4	0-22	9/1347	0.7	0-6
<i>Phéochromocytome</i>	11/1330	0.8	0-5	14/1330	1.1	0-4
<i>Adénome sous-capsulaire</i>	17/1336	1.3	0-20	0/1347	0	-
Glande thyroïde						
<i>Adénome folliculaire</i>	20/1343	1.5	0-4	24/1340	1.8	0-8
<i>Adénome des cellules C</i>	1/1343	0.1	0-2	0/1340	0	-
Pancréas endocrine						
<i>Adénome des îlots de Langerhans</i>	11/1334	0.8	0-4	13/1334	1.0	0-6
Système digestif						
Intestin grêle						
<i>Adénome</i>	5/1355	0.4	0-4	2/1353	0.1	0-2
Foie						
<i>Adénome hépatocellulaire</i>	397/1350	29.4	4-60	234/1350	17.3	2-50
<i>Adénocarcinome hépatocellulaire</i>	241/1350	17.9	6-29	113/1350	8.4	0-20
<i>Hémangiome</i>	3/1350	0.2	0-2	5/1350	0.4	0-2
Glande salivaire						
<i>Tumeur mixte maligne</i>	0/1351	0	-	0/1337	0	-
Vésicule biliaire						
<i>Adénome</i>	2/1223	0.2	0-2	0/1269	0	-
Système hématolymphopoiétique						
<i>Lymphome malin</i>	113/1355	8.3	2-20	283/1353	20.9	6-42
<i>Sarcome histiocytaire</i>	7/1355	0.5	0-4	19/1353	1.4	0-4
<i>Mastocytome</i>	1/1355	0.1	0-2	0/1353	0	-
Rate						
<i>Hémangiome</i>	1/1341	0.1	0-2	3/1341	0.2	0-2
<i>Hémangiosarcome</i>	29/1341	2.2	0-8	17/1341	1.3	0-6
Thymus						
<i>Thymome bénin</i>	0/1091	0	-	3/1174	0.2	0-3

Organe/Tumeur	Mâles			Femelles		
	Incidence	%	Min- Max (%)	Incidence	%	Min- Max (%)
Système reproducteur						
Ovaire						
<i>Lutéome bénin</i>				3/1323	0.2	0-2
<i>Hémangiome</i>				3/1323	0.2	0-4
<i>Tumeur bénigne des cellules de la granulosa</i>				10/1323	0.8	0-4
Prostate						
<i>Papillome</i>	0/1337	0	-			
Testicule						
<i>Leydigome bénin</i>	5/1353	0.4	0-2			
Utérus						
<i>Polype stromal endométrial</i>	44/1353	3.3	0-16			
<i>Polype glandulaire</i>	0/1353	0	-			
<i>Adénome</i>	1/1353	0.1	0-2			
<i>Hémangiome</i>	2/1353	0.1	0-2			
Système circulatoire						
Tous sites						
<i>Hémangiome</i>	7/1355	0.5	0-4	22/1353	1.6	0-8
<i>Hémangiosarcome</i>	73/1355	5.4	0-12	37/1353	2.7	0-8
Divers						
Glande de Harder						
<i>Adénome</i>	64/1355	4.7	0-18	45/1355	3.3	0-10
Moelle épinière						
<i>Sarcome à cellules fusiformes</i>	0/1355	0	-	0/1355	0	-
Peau						
<i>Tumeur folliculaire bénigne</i>	1/1355	0.1	0-2	0/1355	0	-
<i>Carcinome basocellulaire</i>	1/1355	0.1	0-2	1/1355	0.1	0-2
Poumon						
<i>Adénome bronchiolo- alvéolaire</i>	217/1354	16.0	4-30	80/1352	5.9	0-24
<i>Adénocarcinome bronchiolo-alvéolaire</i>	69/1354	5.1	0-14	32/1352	2.4	0-8
Tissu sous-cutané						
<i>Fibrosarcome</i>	42/1355	3.1	0-24	23/1353	1.7	0-8
<i>Sarcome à cellules fusiformes</i>	15/1355	1.1	0-10	6/1353	0.4	0-4
Tous sites confondus						
<i>Tumeurs bénignes</i>	664/1355	49.0	30-76	610/1353	45.1	24-62
<i>Tumeurs malignes</i>	532/1355	39.3	22-54	532/1353	39.3	26-60
<i>Total des tumeurs</i>	958/1355	70.7	46-92	924/1353	68.3	50-80

**Annexe 11 : Incidence des tumeurs observées chez la souris CD-1 au cours de 59 études de
cancérogenèse (d'après Giknis et Clifford, 2005)**

Organe/Tumeur	<i>Mâles</i>			<i>Femelles</i>		
	Incidence	%	Min- Max (%)	Incidence	%	Min- Max (%)
Système endocrin						
Hypophyse						
<i>Adénome de la Pars distalis</i>	8/2874	0.3	0-3	64/3063	2.1	0-14
<i>Adénome de la Pars intermedia</i>	1/2874	0.03	0-2	1/3063	0.03	0-2
Glande parathyroïde						
<i>Adénome</i>	-	-	-	4/2675	0.15	0-3
Glande surrénale						
<i>Adénome cortical</i>	33/2896	1.14	0-7	8/3167	0.25	0-3
<i>Phéochromocytome</i>	11/2896	0.38	1-5	11/3167	0.35	0-5
<i>Adénome sous-capsulaire</i>	2/2896	0.07	0-2	0/3167	0	-
Glande thyroïde						
<i>Adénome folliculaire</i>	14/2893	0.48	0-2	11/3102	0.35	0-2
<i>Adénome des cellules C</i>	1/2893	0.03	0-2	2/3102	0.06	0-3
Pancréas endocrine						
<i>Adénome des îlots de Langerhans</i>	4/2929	0.14	0-2	8/3144	0.25	0-3
Système digestif						
Intestin grêle						
<i>Adénome</i>	1/2820	0.04	0-2	1/3030	0.03	0-2
Foie						
<i>Adénome hépatocellulaire</i>	308/2941	10.5	3-28	31/3110	1	0-8
<i>Adénocarcinome hépatocellulaire</i>	169/2941	5.75	0-16	20/3110	0.64	0-4
<i>Hémangiome</i>	9/2941	0.3	0-4	8/3110	0.26	0-2
Vésicule biliaire						
<i>Adénome</i>	11/2596	0.42	0-5	6/2873	0.21	0-3
Système hématolymphopoiétique						
<i>Lymphome malin</i>	132/2935	4.5	0-22	317/3192	9.9	0-50
<i>Sarcome histiocytaire</i>	46/2935	1.57	0-8	157/3192	4.9	0-18
<i>Mastocytome</i>	4/2935	0.14	0-2	3/3192	0.1	0-2
Rate						
<i>Hémangiome</i>	10/2913	0.34	0-4	3/3142	0.1	0-2
<i>Hémangiosarcome</i>	35/2913	1.2	0-8	18/3142	0.57	0-4
Thymus						
<i>Thymome bénin</i>	0/2304	0	-			

Organe/Tumeur	Mâles			Femelles		
	Incidence	%	Min-Max (%)	Incidence	%	Min-Max (%)
Système reproducteur						
Ovaire						
<i>Lutéome bénin</i>				8/3104	0.26	0-4
<i>Hémangiome</i>				8/3104	0.26	0-3
<i>Tumeur bénigne des cellules de la granulosa</i>				9/3104	0.29	0-3
Prostate						
<i>Papillome</i>	1/2933	0.03	0-2			
Testicule						
<i>Leydigome bénin</i>	25/2946	0.85	0-5			
Utérus						
<i>Polype stromal endométrial</i>				164/3182	5.1	0-17
<i>Adénome</i>				3/3182	0.1	0-2
<i>Hémangiome</i>				17/3182	0.53	0-4
Système circulatoire						
Tous sites						
<i>Hémangiosarcome</i>	29/2935	0.99	0-12	2/3159	0.06	0-2
Divers						
Glande de Harder						
<i>Adénome</i>	152/2907	5.2	0-19	75/3103	2.42	0-8
Glande mammaire						
<i>Adénocarcinome</i>				49/2962	1.65	0-8
Peau						
<i>Tumeur folliculaire bénigne</i>	1/2922	0.03	0-2	0/3232	0	-
<i>Carcinome basocellulaire</i>	0/2922	0	-	2/3232	0.06	0-2
Poumon						
<i>Adénome bronchiolo-alvéolaire</i>	421/2945	14.3	0-42	299/3143	9.5	0-27
<i>Adénocarcinome bronchiolo-alvéolaire</i>	217/2945	7.4	0-26	145/3143	4.6	0-18
Tissu sous-cutané						
<i>Fibrosarcome</i>	6/2922	0.21	0-3	21/3232	0.65	0-7
<i>Sarcome à cellules fusiformes</i>	2/2922	0.07	0-2	3/3232	0.1	0-2

**Annexe 12 : Incidence des lésions pré-tumorales observées chez la souris C57BL/6 au cours
des 7 études de cancérogénèse**

Organe/Lésion	Mâles			Femelles		
	Incidence	%	Min-Max (%)	Incidence	%	Min-Max (%)
Système endocrin						
Hypophyse						
<i>Hyperplasie de la Pars distalis</i>	15/334	4.5	0-6	214/343	62.4	27-88
<i>Hyperplasie de la Pars intermedia</i>	0/334	0	0	12/343	3.5	0-8
Glande surrénale						
<i>Hyperplasie corticale</i>	24/344	7.0	0-10	2/348	0.6	0-2
<i>Hyperplasie médullaire</i>	2/344	0.6	0-2	3/348	0.9	0-4
<i>Hyperplasie sous-capsulaire</i>	146/344	42.4	14-53	342/348	98.3	96-100
Glande thyroïde						
<i>Hyperplasie folliculaire</i>	26/345	7.5	2-13	130/346	37.6	24-56
Système digestif						
Estomac						
<i>Hyperplasie de la muqueuse non glandulaire</i>	87/344	25.3	10-40	89/347	25.6	10-58
Foie						
<i>Foyer(s) d'altération hépatocellulaire basophile</i>	14/348	4.0	0-10	3/350	0.9	0-6
<i>Foyer(s) d'altération hépatocellulaire éosinophile</i>	3/348	0.9	0-2	2/350	0.6	0-2
<i>Foyer(s) d'altération hépatocellulaire tigroïde</i>	1/348	0.3	0-2	0/350	0	0
<i>Foyer(s) d'altération hépatocellulaire clair</i>	1/348	0.3	0-2	1/350	0.3	0-2
Vésicule biliaire						
<i>Hyperplasie épithéliale focale</i>	4/325	1.2	0-2	7/341	2.1	0-10
Système hématolymphopoïétique						
Cecum (follicules lymphoïdes)						
<i>Hyperplasie lymphoïde</i>	10/331	3.0	0-6	2/346	0.6	0-2
Moelle osseuse						
<i>Hyperplasie lymphoïde</i>	1/347	0.3	0-2	5/349	1.4	0-8
<i>Hyperplasie myéloïde</i>	32/347	9.2	0-18	46/349	13.2	0-18
<i>Hyperplasie erythroïde</i>	10/347	2.9	0-6	6/349	1.7	0-4
Nœud lymphatique mésentérique						
<i>Hyperplasie lymphoïde</i>	42/330	12.7	5-20	37/342	10.8	2-33

Organe/Lésion	Mâles			Femelles		
	Incidence	%	Min-Max (%)	Incidence	%	Min-Max (%)
Système hématolymphopoïétique						
Rate						
<i>Hyperplasie lymphoïde</i>	18/343	5.2	0-14	42/349	12.0	4-24
<i>Hyperplasie myéloïde</i>	14/343	4.1	0-6	35/349	10.0	0-28
Système reproducteur						
Ovaire						
<i>Hyperplasie tubulaire</i>				93/348	26.7	18-47
Prostate						
<i>Hyperplasie glandulaire focale</i>	7/344	2.0	0-4			
Testicule						
<i>Hyperplasie des cellules interstitielles</i>	8/349	2.3	0-6			
Vésicule séminale						
<i>Hyperplasie glandulaire focale</i>	4/350	1.1	0-6			
Divers						
Glande de Harder						
<i>Hyperplasie acineuse</i>	9/350	2.6	0-6	21/350	6.0	0-12
Poumon						
<i>Hyperplasie bronchiolo-alvéolaire</i>	18/349	5.2	2-10	7/349	2.0	0-6

