

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

Toxicité (subchronique) par inhalation : étude sur 90 jours

RÉSUMÉ

1. La présente Ligne directrice 413 révisée (LD 413) a été conçue afin de caractériser pleinement la toxicité par inhalation du produit chimique testé suite à une exposition subchronique (90 jours), et de fournir des données fiables pour l'estimation quantitative des risques liés à l'inhalation. L'objectif principal de cette révision était d'adapter la Ligne directrice aux essais de nanomatériaux, et de tenir compte des progrès scientifiques dans les essais portant sur des gaz, vapeurs et aérosols inhalés. La conception effective de l'étude principale dépend avant tout de la forme physique du produit chimique testé (gaz, vapeur, aérosol liquide ou aérosol solide), ainsi que de l'existence ou non d'une étude de détermination des concentrations ou d'autres données indiquant que le produit chimique testé est susceptible d'être déposé et retenu dans les poumons causant des effets locaux ou systémiques à long terme. L'étude principale porte au minimum sur des groupes de 10 rongeurs mâles et 10 rongeurs femelles exposés 6 heures par jour pendant 90 jours (13 semaines) au produit chimique testé, à trois niveaux de concentration au moins, ainsi qu'à de l'air filtré (témoin négatif) ou au véhicule (témoin véhicule). Les animaux sont sacrifiés dans les 24 heures qui suivent la fin de la période d'exposition. Les animaux sont généralement exposés 5 jours par semaine, mais une exposition de 7 jours par semaine est également admise. Un lavage bronchoalvéolaire (LBA) est pratiqué pour tous les produits chimiques testés. Pour ce faire, les poumons sont divisés: le poumon gauche est utilisé pour réaliser l'évaluation histopathologique, et le poumon droit sert au lavage bronchoalvéolaire dont le liquide produit est analysé. Dans le cas où des groupes de réversibilité font partie de l'étude, ceux devront permettre également l'analyse du liquide de lavage bronchoalvéolaire par répartition des poumons pour les différentes analyses. Dans le cas où un produit chimique testé est susceptible d'être retenu dans les poumons, le directeur de l'étude peut avoir recours à des périodes supplémentaires d'observation post-exposition incluant des mesures de la charge pulmonaire qui peuvent fournir des informations sur la clairance pulmonaire et la

© OCDE (2018)

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu aux conditions décrites sur le site: <http://www.oecd.org/fr/conditionsdutilisation>.

Selon la Décision du Conseil de déléguer son autorité pour les amendements à l'Annexe I de la Décision du Conseil sur l'Acceptation Mutuelle des Données dans l'Évaluation des Produits Chimiques [C(2018)49], cette Ligne directrice a été approuvée par la Réunion Conjointe du Comité des Produits Chimiques et le Groupe de Travail sur les Produits Chimiques, les Pesticides et la Biotechnologie, par procédure écrite le 25 juin 2018.

translocation, cette dernière étant particulièrement pertinente dans le cas où le produit chimique testé est un nanomatériau solide. La présente ligne directrice permet en outre de conduire des investigations de nature optionnelle, portant par exemple sur la toxicocinétique des produits chimiques et/ou leur toxicité systémique (immunotoxicité, toxicité hépatique, neurologique et/ou cardiovasculaire, par exemple), afin de caractériser de manière plus complète la toxicité du produit chimique testé. On trouvera plus d'éléments d'orientations sur d'éventuelles observations complémentaires et leur analyse dans une édition révisée du document d'orientation de l'OCDE n° 39 (1).

INTRODUCTION

2. Les Lignes directrices de l'OCDE sont régulièrement révisées à la lumière des progrès scientifiques en matière d'évaluation des réponses toxicologiques, de considérations relatives au bien-être des animaux et de l'évolution des exigences réglementaires. La première version de la Ligne directrice 413 (LD 413) a été adoptée en 1981 (2). Une révision est intervenue en 2009, afin de prendre en compte l'état de la science et de répondre aux exigences réglementaires en cours et à venir. L'objectif principal de la présente révision est d'adapter le texte aux essais d'aérosols sous forme de particules incluant des nanomatériaux. Il est noté que les nanoparticules et les particules fines forment un continuum, et que les échantillons de nanoparticules manufacturées tendent à s'agglomérer dans l'atmosphère du milieu d'étude, en fonction de la méthode utilisée pour les générer et de leur composition physique et chimique. Cette dernière version de la Ligne directrice présente notamment les spécificités suivantes :

- Des mesures spécifiques doivent être pratiquées sur le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LLBA) pour tous les produits chimiques testés, en divisant les poumons pour l'histopathologie d'un côté et pour l'analyse du liquide de lavage bronchoalvéolaire de l'autre. Tout groupe de réversibilité devra également comporter une analyse du liquide de lavage bronchoalvéolaire.
- Des mesures de la charge pulmonaire, fournissant des informations sur la déposition pulmonaire et la rétention des particules dans les poumons, devront être effectuées lorsqu'une étude de détermination des concentrations ou d'autres données pertinentes suggèrent que les particules d'essai inhalées sont peu solubles et susceptible d'être retenu dans les poumons. L'analyse des mesures sur le LLBA et les mesures de la charge pulmonaire sont réalisées pour tous les produits chimiques testés dans les 24 h qui suivent la fin de l'exposition, ainsi qu'éventuellement à un ou deux intervalles d'observation post-exposition (IPE). La nécessité d'IPE supplémentaires, leur durée et leur positionnement sont déterminés par le directeur d'étude selon l'objectif de l'étude, les résultats de l'étude de détermination des concentrations et/ou d'autres données pertinentes (par exemple IPE 1 pour déterminer la rétention pulmonaire et IPE 1, IPE 2 et IPE 3 quand trois mesures de la charge pulmonaire sont nécessaire pour évaluer la cinétique de la clairance ; voir l'Annexe et le document d'orientation de l'OCDE n° 39).
- L'étude ou les études préalable(s) de détermination des concentrations, essentiellement conduite(s) pour déterminer les niveaux de concentrations dans l'étude principale, devra/ont également comprendre une mesure sur le LLBA, et peut/peuvent aussi inclure des mesures de la charge pulmonaire. La conception de l'étude préalable peut aussi fournir des informations sur la sensibilité de la fonction pulmonaire selon le sexe des animaux, sur la température corporelle, etc.

mais devra/devront être planifiées avec soin afin de ne pas affecter la robustesse de l'étude principale.

- La version de 2009 de la LD 413 exigeait que les aérosols particuliers aient un diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM) de 1-3 µm avec un écart type géométrique (σ ou ETG) de 1.5-3.0. Pour tenir compte de la conduite d'essais sur des aérosols nanométriques et favoriser le dépôt dans la région pulmonaire, un nouveau critère devra être rempli autant que faire se peut : $DAMM \leq 2 \mu m$ avec un σ de 1-3. Une justification est fournie dans le rapport d'étude si ce critère ne peut pas être respecté, avec une description des mesures prises (broyage, par exemple) pour le respecter (voir le document d'orientation de l'OCDE n° 39).

3. Les études de toxicité subchronique par inhalation sont principalement utilisées afin de calculer des concentrations réglementaires en vue d'évaluer les risques pour les travailleurs en milieu professionnel. Elles servent aussi à identifier et estimer les risques liés à l'exposition humaine dans les lieux d'habitation, pour les consommateurs, dans les transports et l'environnement. La présente Ligne directrice permet de caractériser les effets nocifs résultant d'une exposition répétée par inhalation à un produit chimique pendant 90 jours. Les données dérivées des études de toxicité subchronique par inhalation peuvent être utilisées pour des estimations quantitatives des risques, et pour le choix des concentrations dans les études de toxicité chronique. On trouvera dans le document d'orientation de l'OCDE n° 39 (1) la définition des termes techniques utilisés dans la présente Ligne directrice.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

4. Avant d'entreprendre l'étude principale, le laboratoire chargé des essais tiendra compte de toutes les informations disponibles sur le produit chimique testé afin d'améliorer la qualité de l'étude, de réduire à un minimum l'usage d'animaux et d'éviter d'avoir à répéter l'étude. Les informations utiles pour la détermination des concentrations d'essai appropriées sont notamment les suivantes : l'identité, la structure chimique et les propriétés physicochimiques du produit chimique testé ; les résultats de tous les essais de toxicité *in vitro* ou *in vivo* auxquels il a été soumis ; son ou ses utilisations escomptées et les risques d'exposition humaine ; les données (Q)SAR disponibles et les données toxicologiques sur des substances structurellement apparentées ; ainsi que les données issues d'autres études sur l'exposition répétée. Lors d'essais portant sur un aérosol solide, il importe de disposer d'informations sur sa rétention et sur la cinétique dans les poumons. Si une toxicité systémique (immunotoxicité, neurotoxicité, hépatotoxicité, effets cardiovasculaires, par exemple) est attendue ou observée au cours de l'étude, le directeur d'étude peut choisir d'inclure des évaluations appropriées d'effets toxicologiques pertinents. Bien que la durée des expositions par rapport à des examens spécifiques puisse être critique, la conduite de ces activités supplémentaires ne devrait pas interférer avec la conception de l'étude principale.

5. Si le produit chimique testé est généré sous forme d'aérosol de matériau(x) peu soluble(s), il convient de procéder autant que possible à une caractérisation dimensionnelle, morphologique et physicochimique, incluant la mesure de la solubilité. Pour la caractérisation des nanomatériaux, le directeur d'étude consultera l'examen préliminaire des Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques en vue d'évaluer leur applicabilité aux nanomatériaux manufacturés (3) et le document d'orientation de l'OCDE sur la préparation d'échantillons et la dosimétrie (4).

6. La fraction respirable (ou fraction alvéolaire) des particules peu solubles, qui sont lentement éliminées, peuvent s'accumuler au fur et à mesure des périodes d'exposition. Le degré de rétention pulmonaire peut être évalué par des mesures de la charge pulmonaire. Une part de ces particules peut être sujette à une translocation et à une large distribution dans l'organisme. Des mesures de la charge de particules au niveau des ganglions lymphatiques associés aux poumons (GLAP) peuvent indiquer une translocation, qui peut être confirmée par des mesures de la charge au niveau des organes cibles. Les effets d'une translocation peuvent être évalués d'après les effets toxicologiques systémiques. Les données relatives à la charge pulmonaire ne peuvent pas être utilisées pour exclure la pertinence de données toxicologiques issues de l'expérimentation animale pour l'évaluation des risques pour l'homme. Pour plus de précisions, se reporter au document d'orientation de l'OCDE n° 39 (1).

7. Les dilutions de substances corrosives ou irritantes peuvent être testées à des concentrations qui permettront d'atteindre le degré de toxicité désiré. Lors de l'exposition des animaux à ces substances, les concentrations cibles seront assez faibles pour ne causer ni souffrance manifeste ni détresse, mais suffisantes pour prolonger la courbe concentration-réponse jusqu'à des niveaux correspondant à l'objectif scientifique et réglementaire de l'essai. Le choix de ces concentrations se fait au cas par cas, de préférence sur la base d'une étude préliminaire de détermination des concentrations conçue de façon appropriée, et qui fournit des informations sur l'effet critique mesuré, un éventuel seuil d'irritation et le moment de son apparition (voir les paragraphes 14-16). Une justification du choix des concentrations est fournie.

8. Les animaux moribonds ou présentant des signes de souffrance manifeste ou de détresse sévère et persistante sont euthanasiés. Les animaux moribonds sont pris en compte au même titre que ceux qui succombent au cours de l'essai. Le document d'orientation de l'OCDE n° 19 sur les effets mesurés éthiquement acceptables (5) détaille les critères orientant la décision d'euthanasier les animaux moribonds ou en grande souffrance, et aide à reconnaître une mort prévisible ou imminente.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Sélection de l'espèce animale

9. On utilisera de jeunes rongeurs adultes en bonne santé, de souches communément utilisées en laboratoire. Le rat étant l'espèce la plus utilisée, l'emploi d'autres espèces devra être justifié.

Préparation des animaux

10. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Le jour de la randomisation, les animaux sélectionnés sont de jeunes adultes âgés de 7 à 9 semaines. Leur poids corporel n'excède pas $\pm 20\%$ du poids moyen pour chaque sexe. Sélectionnés au hasard, les animaux sont marqués pour être identifiés individuellement. En vue de leur acclimatation aux conditions de laboratoire, ils sont conservés dans leur cage pour une période de 5 jours au minimum avant le début de l'essai.

Conditions d'élevage des animaux

11. Les animaux sont identifiés de façon individuelle, de préférence à l'aide de dispositifs sous-cutanés, afin de faciliter leur observation et d'éviter toute confusion. La température du local expérimental où les animaux sont conservés est maintenue à

22 ± 3 °C. Le taux d'humidité relative est idéalement maintenu entre 30 et 70 %. Avant et après exposition, les animaux sont généralement mis en cage en groupes par sexe et par concentration, mais le nombre d'animaux par cage ne doit pas faire obstacle à une observation précise de chaque animal, et ne doit engendrer qu'un minimum de pertes dues au cannibalisme et aux combats. Si les animaux sont exposés « nez seul », il est nécessaire de s'assurer que les tubes de contention ne provoquent pas chez les animaux de stress excessif, qu'il soit de nature physique, thermique ou dû à leur immobilisation. Les animaux devront être acclimatés aux tubes de contention à moins que les données du laboratoire ne démontrent que le stress n'est pas préoccupant. Les animaux exposés « corps entier » à un aérosol peuvent être enfermés individuellement pendant l'exposition pour empêcher la filtration de l'aérosol d'essai par la fourrure des congénères. À l'exception des périodes d'exposition, le régime alimentaire des animaux est le régime classique et certifié de laboratoire, avec eau potable à satiété. L'éclairage est artificiel, avec une alternance de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité.

Chambres d'inhalation

12. Les études de toxicité subchronique par inhalation sont toujours réalisées dans des chambres d'inhalation en conditions dynamiques. L'utilisation d'une chambre d'inhalation statique, sans écoulement d'air, n'est pas acceptable. Le choix de la chambre d'inhalation prend en compte la nature du produit chimique testé et l'objet de l'essai. Le mode d'exposition « nez seul » (qui inclut les dispositifs « tête seule », « nez seul » et « museau seul ») est privilégié pour les études d'aérosols liquides ou solides et pour les vapeurs susceptibles de se condenser en aérosols. L'utilisation d'un mode d'exposition « corps entier » en conditions dynamiques peut être préférable pour les besoins spécifiques de l'étude, mais doit alors être justifiée dans le rapport d'étude. Afin d'assurer la stabilité de l'atmosphère dans une chambre d'exposition « corps entier », on veillera à ce que le « volume » total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre. Le document d'orientation n° 39 (1) décrit les principes des techniques d'exposition « corps entier » ou « nez seul », ainsi que leurs avantages et inconvénients spécifiques.

ÉTUDES DE TOXICITÉ

Concentrations limites

13. La concentration maximale testée prend en compte : 1) la concentration maximale pouvant être atteinte, 2) la nécessité de maintenir une alimentation adéquate en oxygène, et/ou 3) le bien-être des animaux. En l'absence de limites fondées sur des données, les valeurs limites pour la toxicité aiguë du Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des Nations-Unies peuvent être utilisées (à savoir une concentration maximale de 5 mg/l pour les aérosols, 20 mg/l pour les vapeurs et 20 000 ppm pour les gaz). S'il est nécessaire de dépasser ces limites lors d'essais de gaz ou de produits chimiques hautement volatils (comme les réfrigérants), une justification est produite. Pour les essais sur des particules aérosols, une concentration supérieure à 2mg/L ne devra être recherchée que si la taille de la particule respirable peut être atteinte et maintenue au cours de la phase d'exposition (se référer au Document d'orientation de l'OCDE No. 39 (1)).

Étude préliminaire de détermination des concentrations

14. La conception de l'étude principale dépend en grande partie des données recueillies lors d'une étude de détermination des concentrations. Une étude de

détermination des concentrations doit être réalisée, à moins que des données préexistantes ne fournissent des bases suffisamment fiables pour la conduite de l'étude principale. Si l'objectif premier de l'étude de détermination des concentrations est d'orienter le choix des niveaux de concentration pour l'étude principale, elle peut aussi fournir des données complémentaires contribuant à la fiabilité de l'étude principale, en particulier en cas d'essai portant sur des aérosols solides peu solubles. Une étude de détermination des concentrations peut notamment fournir des informations sur les méthodes analytiques, la granulométrie des particules, leur toxicité systémique, la toxicocinétique, la solubilité du produit chimique testé dans les poumons, la translocation des particules, la mise en évidence des mécanismes de toxicité, la pathologie clinique (hématologie/chimie clinique), l'histopathologie, les marqueurs biologiques d'une atteinte pulmonaire, la sensibilité selon le sexe, les données relatives au LLBA, et des estimations du niveau prévisible de la concentration sans effet nocif observé (CSENO), de la concentration minimale avec effet nocif observé (CMENO), de la concentration maximale tolérée (CMT) et/ou de la concentration repère dans l'étude principale. Le directeur d'étude peut utiliser une étude de détermination des concentrations afin d'identifier la concentration maximale tolérée sans stress excessif pour les animaux, et les paramètres les mieux à même de caractériser la toxicité du produit chimique testé. Des LBA peuvent être pratiqués, dans une étude de détermination des concentrations, à la fin de la période d'exposition puis périodiquement au cours d'une période post-exposition. Dans les essais sur des aérosols solides, la solubilité du produit chimique testé et la charge pulmonaire post-exposition peuvent être mesurées, en vue de déterminer la durée de la période post-exposition et le positionnement dans le temps des intervalles post-exposition lors de l'étude principale. En outre, la mesure de la charge dans les ganglions lymphatiques associés aux poumons (GLAP) peut fournir des informations sur la translocation.

15. Une étude de détermination des concentrations peut porter sur un ou plusieurs niveaux de concentration du produit chimique testé et un groupe témoin. Selon le choix des effets mesurés, on exposera généralement au maximum 5 mâles et 5 femelles à chaque niveau de concentration. L'étude, qui durera au minimum 5 jours et n'excédera généralement pas 28 jours, peut inclure une période post-exposition, le nombre d'animaux devra être alors adapté en conséquence. En cas d'essai portant sur des particules peu solubles, il peut être nécessaire de prolonger l'étude de détermination des concentrations au-delà de 28 jours, afin de permettre une évaluation fiable de la solubilité du produit chimique testé et de la charge pulmonaire. Les raisons du choix des concentrations retenues pour l'étude principale seront exposées dans le rapport d'étude. Pour plus de précisions sur la détermination des concentrations, se reporter au document d'orientation n° 39 (1).

Étude principale

L'étude principale comprend au moins trois niveaux de concentration et des témoins simultanés pour l'air (témoins négatifs) et/ou pour le véhicule (cf. paragraphe 30). Deux options sont exposées en Annexe pour la conception de l'étude, selon la nature du produit chimique testé. Outre l'option A, qui s'applique généralement aux produits chimiques tels que les gaz, les vapeurs, les aérosols, ou un mélange de ceux-ci, l'option B s'applique à l'essai des produits chimiques susceptibles d'être retenus dans les poumons. Les options A et B présentées dans l'annexe sont des exemples de schémas types, mais la conception effective de l'étude est à la discrétion du directeur d'étude. Les données d'une étude de détermination des concentrations et toutes les autres données pertinentes disponibles

seront utilisées pour concevoir l'étude et choisir les niveaux d'exposition appropriés (voir les paragraphes 14-16).

17. Chaque groupe comprend au minimum 10 rongeurs mâles et 10 rongeurs femelles exposés au produit chimique testé 6 heures par jour et 5 jours par semaine pendant 13 semaines (soit une durée totale de l'étude d'au moins 90 jours). Les animaux peuvent aussi être exposés 7 jours par semaine. Dans le cas d'essais sur des produits chimiques qui sont susceptibles d'être retenus dans les poumons (option B de l'Annexe), un groupe satellite de 5 mâles par concentration (soit au minimum 20 animaux) est exposé en même temps que les groupes de l'étude principale et évalué à l'IPE-1 pour des mesures de la charge pulmonaire à la fin de l'exposition, afin de recueillir des informations sur la dose retenue. Si l'étude de détermination des concentrations montre qu'un sexe est plus sensible à un produit chimique testé, il est possible d'appliquer des niveaux de concentration différents selon le sexe, afin d'optimiser la relation concentration-réponse telle que décrite au paragraphe 21.

18. Si des espèces de rongeurs autres que le rat sont exposées « nez seul », il est possible d'ajuster la durée maximale d'exposition en fonction du stress propre à ces espèces. Si la durée d'exposition est inférieure à 6 heures par jour ou s'il est nécessaire de mener une étude d'exposition « corps entier » de longue durée (22 heures par jour, par exemple), des justifications seront fournies.

19. Les animaux sont privés de nourriture pendant l'exposition sauf si sa durée dépasse 6 heures. Pendant une exposition « corps entier », les animaux peuvent boire de l'eau.

20. Les concentrations cibles choisies doivent permettre d'identifier le ou les organes cibles et de mettre en évidence une relation concentration-réponse claire :

- Le niveau de concentration le plus élevé devra être clairement toxique sans être à l'origine d'une létalité ou de signes persistants pouvant conduire à une létalité ou empêcher une évaluation probante. Dans les essais sur des aérosols, la concentration la plus élevée peut être le niveau maximal qu'il est possible d'atteindre tout en respectant le critère de répartition granulométrique des particules (voir le paragraphe 40).
- Le ou les niveaux de concentration intermédiaires sont espacés de manière à produire une gradation dans les effets toxiques observés entre la concentration la plus faible et la concentration la plus élevée.
- La concentration la plus faible, qui sera idéalement une CSENO, doit induire des signes de toxicité faibles ou nuls.

Sacrifices en cours d'essai

21. Si l'on envisage le sacrifice d'animaux au cours de la période d'exposition de l'étude principale, il faut accroître le nombre d'animaux exposés à chaque niveau de concentration du nombre prévu d'animaux sacrifiés avant la fin de l'épreuve. Le recours aux sacrifices en cours d'essai sera justifié, et les analyses statistiques en tiendront dûment compte.

Groupes satellites

22. Des groupes satellites peuvent être ajoutés à l'étude principale afin d'évaluer la réversibilité, la persistance ou la manifestation retardée de la toxicité, ou la charge

pulmonaire sur une période post-traitement de durée appropriée. L'Annexe comporte des exemples d'études principales incluant des groupes satellites. Il est noté que le directeur d'étude peut modifier la conception d'une étude sur la base des caractéristiques physicochimiques et de la cinétique du produit chimique testé, afin d'obtenir des données plus fiables. Tous les groupes satellites sont exposés en même temps et aux mêmes niveaux de concentration que les sujets de l'étude principale, et il doit y avoir des témoins simultanés pour l'air ou le véhicule s'il y a lieu (voir le paragraphe 30). La programmation de groupes satellites et leur conception dépendent de la nature du produit chimique testé, c-à-d. si c'est un aérosol solide et s'il est susceptible d'être retenu dans les poumons, selon le logigramme décisionnel pour la charge pulmonaire présenté en Annexe. Si le produit chimique testé est susceptible d'être retenu dans les poumons, l'étude principale est conduite selon l'option B ; dans le cas contraire, l'option A est appliquée. Des groupes satellites peuvent être inclus pour l'évaluation de la réversibilité dans l'option A ; l'option B prévoit des groupes satellites pour l'évaluation de la réversibilité et/ou des mesures de la charge pulmonaire.

23. Les groupes satellites à l'IPE-2 destinés à l'évaluation de la réversibilité sont constitués de 5 mâles et 5 femelles par concentration pour l'option A comme pour l'option B. Ces groupes sont exposés en même temps et aux mêmes niveaux de concentration que les sujets de l'étude principale, et il doit y avoir des témoins simultanés pour l'air ou le véhicule s'il y a lieu (voir le paragraphe 30).

24. Lors d'essais sur des aérosols solides peu solubles susceptibles d'être retenus dans les poumons (option B en Annexe), un ou deux groupes satellites supplémentaires de 5 mâles par concentration peuvent être ajoutés afin de mesurer la charge pulmonaire à différents moments de la période post-exposition. Ces mesures supplémentaires de la charge pulmonaire (à IPE-2 et/ou IPE-3) peuvent être ajoutées à la conception lorsque le directeur d'étude souhaite comprendre la cinétique de la clairance post-exposition du produit chimique testé. Trois points dans le temps étant généralement requis pour obtenir des données sur la cinétique de la clairance, les mesures de la charge pulmonaire sont pratiquées dans les 24 heures suivant la fin de l'exposition (IPE-1) et à deux autres IPE (IPE-2 et IPE-3). Cependant, l'utilisation de deux points dans le temps peut fournir des informations suffisantes dans certains cas, par exemple lorsque l'objectif principal de l'étude est d'établir si la clairance est très lente. Il est préférable de mesurer la charge pulmonaire sur les mâles, dont le volume respiratoire par minute est supérieur à celui des femelles, et qui peuvent donc avoir une charge pulmonaire plus élevée.

25. Sur la base des résultats de l'étude de détermination des concentrations et des autres données pertinentes disponibles, le directeur d'étude choisit la durée de la période post-exposition, ainsi que le positionnement dans le temps de l'IPE-2 pour les groupes d'étude de la réversibilité et, dans l'option B, celui de l'IPE-3 pour les groupes satellites destinés à l'étude de la charge pulmonaire (voir l'Annexe). Le positionnement dans le temps de l'IPE-2 et de l'IPE-3 dans l'option B dépendra de la vitesse de clairance pulmonaire attendue et de la durée de la période de rétablissement post-exposition. Les options suivantes sont également possibles :

- Le directeur d'étude peut choisir de placer l'IPE-3 avant le groupe d'étude de la réversibilité (IPE 2) (le cas échéant), s'il considère que cela est plus approprié.
- Lorsque l'utilisation de deux points d'évaluation post-exposition est considérée comme suffisante, il est possible de ne mesurer la charge pulmonaire qu'à l'IPE-1 (étude principale) et l'IPE-2 (groupe d'étude de la réversibilité), si les plannings

d'évaluation de la réversibilité et de la clairance pulmonaire peuvent être harmonisés. Le groupe satellite à l'IPE-3 peut alors être omis de l'étude.

- Le directeur d'étude peut choisir de pratiquer les mesures de la charge pulmonaire à l'IPE-1 (étude principale) et l'IPE-3 (groupe satellite) et d'utiliser les deux sexes dans les groupes d'étude de la réversibilité (IPE-2) pour les mesures portant sur l'analyse du LLBA.

26. Il convient de choisir avec soin les IPE et leur positionnement dans le temps, pour ne pas avoir à répéter les études. Le directeur d'étude justifiera le choix des IPE en faisant clairement état de ces aspects.

27. Des analyses du LLBA sont nécessaires à la fin de l'exposition (IPE-1) et lors d'autre(s) IPE s'ils ont été planifiés. Si des mesures de la charge pulmonaire sont effectuées (option B), les analyses du LLBA dans le groupe d'étude de la réversibilité (IPE-2) ne seront pratiquées que sur les femelles, car les mâles de ces groupes seront utilisés pour les mesures de la charge pulmonaire (voir le paragraphe 25).

28. Bien que dans l'option B, des groupes supplémentaires soient prévus uniquement pour les mesures de la charge pulmonaire (étude principale à l'IPE-1 et groupe satellite à l'IPE-2 et l'IPE-3), il peut être envisagé d'utiliser ces animaux pour d'autres paramètres pouvant aider à comprendre la toxicocinétique et la toxicité (y compris la réversibilité des effets) des produits chimiques testés (voir le document d'orientation de l'OCDE n° 39). Ces paramètres supplémentaires sont désignés comme étant "à déterminer" dans l'Annexe. Les observations faites à l'IPE-1 peuvent être utilisées pour décider des paramètres supplémentaires à examiner à l'IPE-3, par exemple, si l'intervalle de temps entre l'IPE-1 et l'IPE-2 le permet. Des examens histopathologiques complémentaires peuvent notamment être pratiqués sur le poumon gauche ou d'autres organes à l'IPE-3.

Animaux témoins

29. Les animaux du groupe témoin simultané négatif (air) sont traités d'une manière identique à ceux du groupe exposé, mais au lieu du produit chimique testé, ils reçoivent de l'air filtré. Lorsqu'un véhicule autre que l'eau est utilisé pour produire l'atmosphère d'essai, un groupe témoin pour le véhicule est inclus dans l'étude, à la place du groupe témoin négatif exposé à l'air. Autant que possible, l'eau est le véhicule utilisé. Dans ce cas, les animaux témoins sont exposés à un air dont le taux d'humidité relative est le même que pour les groupes exposés au produit chimique testé. Le choix du véhicule s'opère sur la base d'une étude préliminaire appropriée ou de données historiques. Il est déconseillé d'utiliser à la fois un groupe témoin négatif (pour l'air) et un groupe témoin pour le véhicule, à moins que les connaissances sur la toxicité du véhicule soient insuffisantes. Si des données historiques montrent qu'un véhicule n'est pas toxique, le groupe témoin pour l'air n'est pas nécessaire et seul un témoin du véhicule est utilisé. Si aucune toxicité n'a été détectée lors de l'étude préliminaire d'un produit chimique testé préparé dans un véhicule, ce véhicule est considéré comme non toxique à la concentration testée et est utilisé comme témoin.

CONDITIONS D'EXPOSITION

Administration des concentrations

30. Les animaux sont exposés au produit chimique testé sous forme de gaz, de vapeur ou d'aérosol, ou d'un mélange de ces différentes formes. L'état physique à tester dépend

des propriétés physicochimiques du produit chimique testé, des concentrations choisies, et/ou de la forme physique sous laquelle il est le plus probable qu'il se présente lors de sa manipulation et de son utilisation. Les produits hygroscopiques ou chimiquement réactifs sont testés sous air sec. On prendra soin d'éviter les concentrations susceptibles de provoquer une explosion. Afin de se conformer au critère énoncé aux paragraphes 40 à 43, on pourra soumettre les matériaux solides à des traitements mécaniques (broyage) destinés à réduire la taille des particules. Pour plus d'informations, se reporter au document d'orientation de l'OCDE n° 39 (1).

Préparation du produit chimique testé dans un véhicule

31. Idéalement, le produit chimique doit être testé sans véhicule, et les aérosols solides sont générés à sec. S'il est nécessaire d'utiliser un véhicule pour générer un produit chimique à la concentration et à la granulométrie appropriée pour l'essai, on utilisera de l'eau dans la mesure du possible. Si un produit chimique est dissous dans un véhicule, on démontrera la stabilité de la solution.

CONTRÔLE DES CONDITIONS D'EXPOSITION

Débit d'air dans la chambre d'exposition

32. Le débit d'air dans la chambre d'exposition est contrôlé avec soin, surveillé en continu et enregistré au minimum toutes les heures pendant chaque exposition. Le suivi en temps réel de la concentration de l'atmosphère d'essai (stabilité temporelle) constitue une mesure intégrale de tous les paramètres dynamiques et fournit un moyen indirect de contrôler tous les paramètres d'inhalation dynamiques pertinents. Si la concentration est suivie en temps réel, la fréquence de mesure du débit d'air peut être ramenée à une seule mesure par exposition et par jour. On prendra particulièrement soin d'éviter toute re-respiration dans les chambres d'exposition « nez seul ». La concentration d'oxygène est d'au moins 19 % et celle de dioxyde de carbone ne dépasse pas 1 %. S'il y a lieu de craindre que ces conditions ne soient pas respectées, les concentrations d'oxygène et de dioxyde de carbone seront mesurées. Si les mesures du premier jour d'exposition montrent que la concentration de ces gaz est appropriée, aucune mesure complémentaire ne devrait être nécessaire.

Température et humidité relative de la chambre d'exposition

33. La température de la chambre d'exposition est maintenue à 22 ± 3 °C. L'humidité relative dans la zone où respire l'animal, qu'il s'agisse d'une exposition « nez seul » ou « corps entier », est autant que possible surveillée en continu et enregistrée toutes les heures pendant chaque exposition. L'humidité relative est de préférence comprise entre 30 % et 70 %. Il est possible que ce taux ne puisse pas être atteint (par exemple lorsque le produit chimique testé se présente sous forme de solution aqueuse), ou qu'il ne puisse pas être mesuré en raison d'interférences du produit chimique testé avec la méthode d'essai.

Produit chimique testé : concentration nominale

34. La concentration nominale est la masse du produit chimique testé divisée par le volume d'air total qui passe dans le circuit de la chambre d'inhalation. Dans la mesure du possible, la concentration nominale dans la chambre d'exposition est calculée et enregistrée. La concentration nominale ne sert pas à caractériser l'exposition des animaux, mais une comparaison de la concentration nominale avec la concentration réelle

donne une indication de l'efficacité du système d'essai en matière de génération d'atmosphère, et peut donc permettre de mettre en évidence des problèmes à ce niveau.

Produit chimique testé : concentration réelle

35. La concentration réelle est la concentration du produit chimique testé dans un prélèvement effectué au niveau de la zone respiratoire des animaux dans une chambre d'inhalation. Les concentrations réelles peuvent être obtenues par des méthodes spécifiques (échantillonnage direct, méthodes d'adsorption ou de réaction chimique, par exemple, et caractérisation analytique ultérieure) ou par des méthodes non spécifiques comme la gravimétrie sur filtre. Le recours à l'analyse gravimétrique n'est acceptable que pour des aérosols solides ne contenant qu'un seul composant ou pour des aérosols de liquides peu volatils, et devra être étayé par des caractérisations spécifiques au produit chimique testé lors d'une pré-étude appropriée. Il est aussi possible d'avoir recours à la gravimétrie pour déterminer la concentration d'un aérosol solide contenant plusieurs composants, mais des données analytiques sont alors nécessaires, afin de démontrer que la composition du produit en suspension dans l'air est analogue à celle du produit de départ. Faute de cette information, il peut être nécessaire de soumettre le produit à tester (idéalement en suspension dans l'air) à une nouvelle analyse à intervalles réguliers tout au long de l'étude. Pour les agents aérosolisés susceptibles de s'évaporer ou de se sublimer, il faut démontrer que la méthode choisie permet de recueillir toutes les phases.

36. Pendant toute la durée de l'étude, il est recommandé de n'employer si possible qu'un seul lot du produit chimique testé, et l'échantillon de la substance est conservé dans des conditions préservant sa pureté, son homogénéité et sa stabilité. Avant le début de l'étude, il convient de réaliser une caractérisation du produit chimique testé afin de déterminer sa pureté et, si cela est techniquement possible, son identité et les quantités de contaminants et d'impuretés identifiés. Pour cela, on pourra recueillir les données suivantes, par exemple : temps de rétention et surface relative du pic, poids moléculaire obtenu par spectroscopie de masse ou chromatographie en phase gazeuse, ou autres estimations. Bien que le laboratoire d'essai ne soit pas responsable de l'identification du produit chimique testé, il peut, par prudence, confirmer au moins une partie des caractéristiques fournies par le donneur d'ordre (couleur, nature physique, etc.).

37. L'atmosphère d'exposition est maintenue constante autant que possible. Un dispositif de suivi en temps réel, tel qu'un photomètre à aérosol pour les aérosols ou un analyseur d'hydrocarbures totaux pour les vapeurs, peut être utilisé afin de démontrer la stabilité des conditions d'exposition. La concentration réelle dans la chambre est mesurée au moins trois fois par jour d'exposition et pour chaque niveau d'exposition. En cas d'impossibilité en raison de débits d'air limités ou de faibles concentrations, l'utilisation d'un échantillon par période d'exposition est acceptable. Cet échantillon sera recueilli de préférence sur toute la durée de la période d'exposition. Les écarts entre la concentration dans chaque chambre et la concentration moyenne ne devront pas excéder $\pm 10\%$ pour les gaz et vapeurs et $\pm 20\%$ pour les aérosols liquides ou solides. Il convient de calculer et de noter le temps d'équilibre dans la chambre d'exposition (t_{95}). La durée d'une exposition couvre le temps de génération du produit chimique testé, y compris le temps nécessaire pour l'égalisation des concentrations dans la chambre d'exposition (t_{95}) et leur déclin. Des indications pour l'estimation de t_{95} sont fournies dans le document d'orientation n° 39 (1).

38. Pour des systèmes très complexes constitués de gaz ou vapeurs et d'aérosols (atmosphères de combustion ou produits testés propulsés à partir de produits/dispositifs

spécialisés, par exemple), chaque phase peut se comporter différemment dans la chambre d'inhalation. Pour chacune des phases (gaz ou vapeur et aérosol), on choisira donc au moins une substance indicatrice (analyte), en général la substance active principale dans la formulation du produit chimique testé. Lorsque le produit chimique testé est un mélange (une préparation, par exemple), la concentration réelle devra être indiquée pour la préparation complète, et pas uniquement pour le principe actif ou le composant (analyte). Pour plus d'informations sur les concentrations réelles, se reporter au document d'orientation n° 39 (1).

Produit chimique testé : répartition granulométrique des aérosols

39. Pour que l'exposition de l'appareil respiratoire inférieur soit assurée, un aérosol doit répondre au critère suivant dans la mesure du possible : diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM) $\leq 2 \mu\text{m}$, pour un écart type géométrique (ETG ou σ_g) de 1-3 chez le rat (voir le document d'orientation de l'OCDE n° 39). Il convient de faire un effort raisonnable pour satisfaire à ce critère, mais on aura recours à un jugement d'expert si cela n'est pas réalisable en pratique. La taille des particules sera mesurée pour les vapeurs susceptibles de se condenser et de former des aérosols. Des modèles de dépôt peuvent être utilisés afin d'estimer quelle quantité ou fraction d'un aérosol atteint des parties spécifiques du tractus respiratoire. Cette estimation peut également être étayée par des données sur la charge pulmonaire après une exposition unique. En cas d'essai sur des espèces autres que le rat, des exigences similaires s'appliquent en ce qui concerne la granulométrie de l'aérosol utilisé, qui doit se traduire par une exposition suffisante du tractus respiratoire inférieur, et le choix de l'aérosol devra être justifié selon ce critère. Une justification sera fournie dans le rapport d'étude si le critère relatif au DAMM ne peut pas être respecté.

40. La répartition granulométrique des aérosols de particules fines est déterminée de préférence chaque semaine pour chaque niveau de concentration, à l'aide d'un impacteur en cascade ou d'un autre instrument, comme un granulomètre thermodynamique ou optique. S'il peut être démontré que les résultats obtenus avec l'impacteur en cascade et l'autre instrument sont équivalents, ce dernier peut être utilisé tout au long de l'étude.

41. Les granulomètres de mobilité électrique à balayage, analyseurs différentiels de mobilité ou granulomètres de mobilité aérodynamique sont préférés, dans le cas des nanomatériaux non fibreux et isométriques, que ce soit pour le comptage des particules ou pour la distribution granulométrique des aérosols d'exposition. Pour tous les matériaux, y compris les matériaux fibreux, il est possible d'utiliser des impacteurs à micro-orifices à dépôt uniforme pour la détermination des concentrations d'exposition en termes de masse et de distribution de taille. Au moins deux méthodes différentes de détermination de l'exposition quantitative aux particules (comptage des particules, distribution granulométrique ou masse des particules) seront utilisées. Les aérosols produits lors de l'utilisation de nanomatériaux sont généralement constitués de particules agglomérées, et la distribution granulométrique peut inclure à la fois des particules micro- et nanométriques. Il peut donc être nécessaire de caractériser les aérosols en utilisant une combinaison des techniques mentionnées plus haut. De plus, la microscopie à balayage et/ou la microscopie électronique à transmission doivent être utilisées périodiquement (une fois par mois, par exemple) pour un monitoring en vue d'obtenir une confirmation qualitative des caractéristiques de taille et de forme des particules non seulement pour les nanomatériaux, mais pour tous les matériaux particulaires. D'autres mesures telles que la superficie de surface des particules peuvent constituer des informations supplémentaires intéressantes.

43. Afin de confirmer la capacité de recueil des particules de l'instrument principal, un second instrument quantitatif devra être utilisé en parallèle, par exemple un filtre gravimétrique ou un barboteur à gaz/impacteur. La concentration massique obtenue par l'analyse granulométrique devra être proche, dans des limites raisonnables, de celle obtenue par l'analyse sur filtre (voir le document d'orientation n° 39) (1). Si, pour toutes les concentrations testées, cette équivalence est établie au début de l'étude, il n'est pas nécessaire d'effectuer des mesures de confirmation dans la suite de l'étude. Pour le bien-être des animaux, il convient de limiter autant que possible les données peu concluantes qui nécessiteraient de répéter l'essai.

OBSERVATIONS

43. Les animaux font l'objet d'un examen clinique avant, pendant et après chaque période d'exposition, ainsi qu'au cours de la ou des périodes post-exposition. Des observations plus fréquentes peuvent être indiquées selon la réponse des animaux pendant l'exposition. Si l'observation des animaux est rendue difficile par les tubes de contention, le mauvais éclairage des chambres d'exposition « corps entier » ou l'opacité de l'atmosphère, les animaux seront observés avec un soin particulier après l'exposition. Les observations effectuées avant l'exposition du lendemain peuvent permettre d'estimer une éventuelle réversibilité ou exacerbation des effets toxiques. Si le protocole d'étude comporte une période post-exposition, les animaux seront examinés au moins une fois par jour durant cette période.

44. Toutes les observations sont enregistrées individuellement pour chaque animal. Quand des animaux sont retrouvés morts ou sont sacrifiés, l'heure de la mort est consignée le plus précisément possible.

45. Les observations quotidiennes portent notamment sur les modifications de la peau et des poils, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux, ainsi que de l'activité somatomotrice et du comportement. Une attention particulière est accordée aux signes suivants : tremblements, convulsions, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. La mesure de la température rectale peut aider à mettre en évidence une bradypnée réflexe, un réflexe de Paintal (stimulation des fibres C) ou une hypo/hyperthermie liée au traitement ou au confinement. Il est possible d'inclure dans le protocole d'étude des évaluations complémentaires telles que : surveillance biologique (recueil des urines/feces), fonction pulmonaire et changements comportementaux.

POIDS CORPOREL

46. Le poids de chacun des animaux est enregistré individuellement juste avant la première exposition (jour 0), deux fois par semaine par la suite (par exemple les vendredis et lundis, afin de mettre en évidence leur rétablissement après un week-end sans exposition, ou dans un délai permettant l'évaluation de la toxicité systémique), et au moment de leur mort ou de leur euthanasie. Si aucun effet significatif sur le poids corporel n'est observé au cours des 4 premières semaines, le poids corporel peut n'être mesuré qu'une fois par semaine pendant le reste de l'étude. Si l'étude inclut une période post-exposition, les animaux seront pesés une fois par semaine. Au terme de l'étude, tous les animaux sont pesés juste avant leur sacrifice afin d'exclure un biais dans le calcul du rapport entre le poids des organes et le poids du corps.

CONSOMMATION D'EAU ET DE NOURRITURE

47. La quantité de nourriture consommée est mesurée une fois par semaine. La consommation d'eau peut également être mesurée. Ces mesures doivent se poursuivre lorsque le protocole d'étude inclut une période post-exposition.

PATHOLOGIE CLINIQUE

48. On procédera périodiquement à des évaluations de pathologie clinique chez tous les animaux exposés et témoins, pendant les périodes d'exposition et de post-exposition, ainsi qu'au moment du sacrifice des animaux. Ces évaluations ne sont pas exigées chez les animaux satellites utilisés pour la mesure de la charge pulmonaire, mais certains paramètres peuvent être évalués à l'IPE-2 et l'IPE-3, si l'on considère qu'ils peuvent aider à comprendre la toxicité (y compris la réversibilité des effets) (voir le paragraphe 29). Le délai entre la fin de l'exposition et le prélèvement de sang est enregistré. À la fin de l'exposition, un prélèvement est recommandé pour les paramètres ayant une courte demi-vie plasmatique (HbCO, ChE et MetHb, par exemple).

49. Le tableau 1 donne la liste des paramètres de pathologie clinique généralement requis pour toutes les études toxicologiques. Une analyse d'urine n'est pas nécessaire en règle générale, mais peut être réalisée si on l'estime utile compte tenu de la toxicité probable ou observée. Afin de mieux caractériser la toxicité du produit chimique testé, le directeur d'étude peut faire appel à d'autres paramètres (cholinestérase, lipides, hormones, équilibre acido-basique, méthémoglobine ou corps de Heinz, créatine kinase, cytologie de la moëlle osseuse, troponines, lactate déshydrogénase, glutamate déshydrogénase, gamma glutamyl transpeptidase, etc.).

Tableau 1 : Paramètres standard de pathologie clinique

* Le directeur d'étude décidera si une période de jeûne est nécessaire ou non pour les animaux, une longue période de jeûne pouvant induire un biais dans la mesure du glucose chez les animaux traités par rapport aux animaux témoins. La période de jeûne sera adaptée à l'espèce utilisée : pour le rat, elle peut être de 16 heures environ (jeûne pendant la nuit). La glycémie à jeun peut être déterminée après la période de jeûne de la nuit pendant la dernière semaine d'exposition, ou après la période de jeûne de la nuit précédant la nécropsie (en même temps, dans ce dernier cas, que tous les autres paramètres de pathologie clinique).

LAVAGE BRONCHOALVÉOLAIRE

50. Une analyse du LLBA est pratiquée à un intervalle post-exposition (dans les 24 h suivant la fin de l'exposition, IPE-1) et à un IPE-2 (voir l'Annexe, option A). En cas d'essai sur un aérosol peu soluble (option B de l'Annexe), l'analyse du LLBA sera pratiquée à la fin de l'exposition sur les deux sexes (IPE-1) et chez les animaux femelles si un groupe d'étude de la réversibilité est planifié à l'IPE-2. Le poumon droit est généralement préféré pour le lavage. La durée de la période post-exposition et le positionnement dans le temps des IPE sont déterminés par le directeur d'étude sur la base des résultats de l'étude de détermination des concentrations et des autres données pertinentes disponibles. Le document d'orientation n° 39 fournit des informations spécifiques sur les paramètres optionnels de l'analyse du LLBA et sur la conduite de cette analyse (1). Les paramètres obligatoires d'analyse du LLBA sont les suivants :

- Lactate déshydrogénase (LDH)

- Protéines totales ou albumine
- Numération et numération différentielle des macrophages, lymphocytes, neutrophiles et éosinophiles alvéolaires

CHARGE PULMONAIRE

51. Lors d'essais sur des aérosols peu solubles, des mesures de la charge pulmonaire peuvent fournir des informations sur la dose retenue. Des mesures de la charge pulmonaire doivent être effectuées lorsque l'étude de détermination des concentrations et d'autres données pertinentes suggèrent que le produit chimique testé est, ou pourrait être, retenu dans les poumons, et lorsqu'une méthode analytique appropriée est disponible. Des mâles sont utilisés car leur volume respiratoire par minute est supérieur à celui des femelles, et leur charge pulmonaire peut donc être plus élevée. Comme l'indique l'Annexe (option B), des groupes de 5 mâles par concentration sont ajoutés à l'étude principale pour les mesures obligatoires de la charge pulmonaire à la fin de l'exposition (IPE-1). Les observations de l'IPE-1 doivent intervenir dans les 24 heures qui suivent la fin de l'exposition, afin de permettre la clairance rapide, par transport mucociliaire, du produit chimique déposé dans la zone de conduction des voies respiratoires. Le directeur d'étude a la possibilité de mesurer la charge pulmonaire dans les groupes satellites d'étude de la réversibilité à l'IPE-2 et l'IPE-3 (voir les paragraphes 18, 24, 25). Afin d'obtenir des données claires sur la cinétique de la clairance pulmonaire, il est conseillé d'utiliser le même poumon (le poumon droit est recommandé) pour toutes les mesures post-exposition de la charge pulmonaire. La durée de la période post-exposition et le positionnement des IPE sont déterminés par le directeur d'étude sur la base des résultats de l'étude de détermination des concentrations et des autres données pertinentes disponibles. Pour plus de précisions sur la mesure et l'évaluation de la charge pulmonaire, voir le document d'orientation n° 39 (et le paragraphe 25).

EXAMEN OPHTALMOLOGIQUE

52. À l'aide d'un ophtalmoscope ou d'un dispositif équivalent, un examen ophtalmologique du fond d'œil, des milieux de réfraction, de l'iris et de la conjonctive doit être effectué chez tous les animaux avant l'administration du produit chimique testé et, au terme de l'étude, sur tous groupes exposés à la concentration élevée et les groupes témoins. Si l'examen ophtalmologique décèle des changements, tous les animaux des autres groupes sont examinés, y compris ceux des groupes satellites.

MACROPATHOLOGIE ET POIDS DES ORGANES

53. Tous les animaux inclus dans l'essai, y compris les animaux morts au cours de l'essai ou écartés de l'étude pour des raisons liées au bien-être animal, subissent une exsanguination complète (si elle est praticable) et une nécropsie macroscopique. Il convient d'enregistrer le délai entre la fin de la dernière exposition et le sacrifice de chaque animal. Lorsqu'un animal est découvert mort et que la nécropsie n'est pas réalisable immédiatement, l'animal est réfrigéré (mais non congelé) à une température suffisamment basse pour limiter l'autolyse. Les nécropsies sont réalisées le plus tôt possible, en général dans un délai d'un à deux jours. Tous les changements macropathologiques sont enregistrés pour chaque animal, une attention particulière étant accordée aux voies respiratoires. Le tableau 2 donne la liste des organes et tissus devant

être conservés dans un milieu approprié lors de la nécropsie macroscopique en vue d'un examen histopathologique.

Tableau 2. Organes et tissus à conserver lors de la nécropsie macroscopique

Note : La conservation des organes et tissus [entre crochets], et de tous les autres organes et tissus, est à la discrétion du directeur d'étude. Les organes indiqués en gras sont découpés et pesés à l'état humide, le plus tôt possible après la dissection, afin d'éviter leur dessiccation. Les organes et tissus sont fixés à l'aide de formol tamponné à 10 %, ou d'un autre fixateur approprié, dès que la nécropsie est effectuée, et pas moins de 24 à 48 heures avant le découpage, en fonction du fixateur utilisé.

* Se référer à la Ligne directrice 407.

54. Le poumon gauche est réservé pour l'évaluation histopathologique et le droit est utilisé pour le LBA, mais l'inverse est également possible. Le poumon gauche est retiré intact, pesé et perfusé avec un fixateur approprié à une pression de 20 à 30 cm d'eau pour préserver l'architecture pulmonaire (6). Si la conception de l'étude inclut des groupes satellites pour la mesure de la charge pulmonaire, les deux poumons peuvent être pesés pour ces animaux.

55. Au moins 4 niveaux des tissus nasopharyngés sont examinés, dont un devant comporter le conduit nasopharyngien (7) (8) (9) (10) (11) pour permettre un examen adéquat de l'épithélium squameux, transitionnel (respiratoire non-cilié), respiratoire (respiratoire cilié) et olfactif, ainsi que du tissu lymphatique (NALT) (12) (13). Trois niveaux du larynx sont examinés, dont un comprenant la base de l'épiglotte (14). Au moins deux niveaux de la trachée sont examinés, y compris une coupe longitudinale le long de la carène de la bifurcation des bronches extrapulmonaires et une coupe transversale. Au moins trois niveaux du poumon gauche (ou droit) représentant différentes régions du lobe sont examinés. Pour plus de précisions, se reporter au document d'orientation n° 125 (7).

56. S'il est nécessaire d'évaluer la translocation du produit chimique testé, la charge de particules dans les organes concernés peut être déterminée dans les échantillons de tissu conservés en vue des examens histopathologiques. Il est donc important d'envisager des techniques de conservation qui permettront d'appliquer un large spectre de méthodes analytiques. Indépendamment des échantillons conservés, le dépôt de particules dans les ganglions lymphatiques associés aux poumons (GLAP) doit être systématiquement déterminé, comme indicateur de translocation lors des essais sur des produits chimiques.

HISTOPATHOLOGIE

57. Une évaluation histopathologique de tous les organes et tissus du tableau 2 est réalisée pour les animaux des groupes témoins et des groupes exposés à une concentration élevée du produit chimique testé, ainsi que pour les animaux morts ou sacrifiés au cours de l'étude. Le directeur d'étude peut choisir de réaliser des évaluations histopathologiques pour des groupes exposés à d'autres concentrations afin de mettre en évidence une relation concentration-réponse claire. Lorsqu'un trop grand nombre de morts précoces ou d'autres problèmes survenant dans le groupe exposé à une concentration élevée compromettent la portée des résultats, le groupe exposé à la concentration immédiatement inférieure est soumis à un examen histopathologique. On portera une attention particulière aux voies respiratoires, aux organes cibles et aux lésions macroscopiques. Les organes et tissus présentant des lésions dans le groupe exposé à une concentration élevée sont examinés pour tous les groupes. Lorsqu'un groupe d'étude de la

réversibilité est utilisé, il y a lieu d'effectuer un examen histopathologique pour tous les tissus et organes ayant présenté des effets dans les groupes traités. Une évaluation histopathologique peut être envisagée pour les groupes satellites utilisés pour les mesures de la charge pulmonaire comme indiqué au paragraphe 29. Il est recommandé d'utiliser le poumon gauche pour l'évaluation histopathologique. On tentera de corrélérer les observations macroscopiques et les constatations au niveau microscopique.

FONCTION PULMONAIRE

58. Si le directeur d'étude a identifié des signes de bradypnée réflexe ou un réflexe de Paintal chez les rongeurs lors de l'étude de détermination des concentrations, ou si d'autres données (hypothermie, par exemple) indiquent que ces réflexes peuvent être présents, l'étendue de ces réflexes sera quantifiée par des mesures périodiques de la fonction pulmonaire et de la température lors de l'étude principale. Pour plus de précisions sur ces réflexes et sur les méthodes d'étude de la fonction pulmonaire, se reporter au document d'orientation n° 39 (1).

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

59. Pour chacun des animaux, les données suivantes sont fournies : poids corporel, consommation de nourriture, pathologie clinique, analyse du LLBA, pathologie macroscopique, poids des organes, charge pulmonaire (lorsqu'elle est évaluée) et histopathologie, tant pour l'étude de détermination des concentrations que pour l'étude principale. Les résultats des observations cliniques sont résumés sous la forme de tableaux indiquant pour chaque groupe d'essai : le nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux présentant des signes spécifiques de toxicité, le nombre d'animaux retrouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, l'heure de la mort de chacun des animaux, la description et l'évolution dans le temps des effets toxiques ainsi que leur réversibilité, et les conclusions de la nécropsie. Toute méthode statistique généralement reconnue peut être utilisée ; il y a lieu de sélectionner les méthodes statistiques au stade de la conception de l'étude.

Rapport d'essai

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

Animaux d'expérience et conditions d'élevage

- Description des conditions d'encagement, et notamment : nombre (ou évolution du nombre) d'animaux par cage, matériel de litière, température ambiante et taux d'humidité relative, photopériode et identification du régime alimentaire.
- Espèces/souches utilisées et justification éventuelle de l'utilisation d'une espèce autre que le rat. Des données sources et historiques peuvent être fournies si elles correspondent à des animaux soumis à des conditions d'exposition, d'encagement et de jeûne similaires.
- Nombre, âge et sexe des animaux.
- Méthode de randomisation.

- Description d'un éventuel conditionnement ou criblage préalable à l'essai, tel que régime alimentaire, quarantaine, examen ophtalmologique ou traitement de maladie.

Produit chimique d'essai

- Nature physique, pureté et, s'il y a lieu, propriétés physicochimiques (y compris isomérisation ou radiomarquage). Les éléments de caractérisation complémentaires qui sont pertinents pour les particules, notamment les nanomatériaux sont les suivants : forme, surface/surface spécifique, chimie de surface, composition (revêtement et modifications de surface compris), charge de surface, solubilité et état d'agrégation/agglomération des particules.
- Données d'identification et numéro CAS (Chemical Abstract Services) s'il est connu.

Véhicule

- Justification de l'emploi d'un véhicule et justification de son choix (en cas de véhicule autre que l'eau).
- Données historiques ou concomitantes démontrant que le véhicule n'interfère pas avec les résultats de l'étude.

Chambre d'inhalation

- Description détaillée de la chambre d'inhalation, indication de son volume.
- Source et description de l'équipement utilisé pour l'exposition des animaux et pour la génération de l'atmosphère.
- Équipement utilisé pour mesurer la température, l'humidité, la granulométrie et la concentration réelle.
- Source d'air et système de climatisation utilisé.
- Méthodes utilisées pour étalonner l'équipement afin d'assurer l'homogénéité de l'atmosphère d'essai.
- Différence de pression (positive ou négative).
- Orifices d'exposition par chambre (« nez seul ») ou emplacement des animaux dans la chambre (« corps entier »).
- Stabilité de l'atmosphère d'essai.
- Situation des capteurs thermiques et hygrométriques et échantillonnage de l'atmosphère d'essai dans la chambre d'exposition.
- Traitement de l'air fourni/évacué.
- Débits d'air, débit d'air/orifice d'exposition (« nez seul ») ou rapport du volume de l'animal à la chambre (« corps entier ») ;
- Temps nécessaire pour atteindre l'équilibre dans la chambre d'exposition (t95).
- Nombre de renouvellements d'air par heure.
- Dispositifs doseurs (s'il y a lieu).

Données sur l'exposition

- Justification du choix des concentrations cibles dans l'étude principale.
- Concentrations nominales (masse totale du produit chimique testé introduite dans la chambre d'inhalation, divisée par le volume d'air traversant la chambre).
- Concentrations réelles de produit chimique testé dans les échantillons prélevés dans la zone où respirent les animaux ; pour les mélanges produisant des formes physiques hétérogènes (gaz, vapeurs, aérosols), chacun des constituants peut être analysé séparément.
- Toutes les concentrations atmosphériques sont données en unités de masse (mg/L, mg/m³, etc.) plutôt qu'en unités de volume (ppm, ppb, etc.).
- Distribution granulométrique des particules, diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM) et écart type géométrique (σ), ainsi que leurs méthodes de calcul. Les analyses de la taille de particules isolées seront consignées. Le diamètre thermodynamique (diamètre médian en nombre ou en masse) est également indiqué pour les aérosols d'essai contenant des particules < 100 nm.
- Analyse du degré d'agglomération des nanoparticules dans l'aérosol.

Conditions de l'essai

- Détails sur la préparation du produit chimique d'essai, notamment sur les procédures utilisées pour réduire la taille des particules des matériaux solides ou pour préparer les solutions du produit chimique testé.
- Description (si possible avec schéma) de l'équipement utilisé pour produire l'atmosphère d'essai et pour exposer les animaux à celle-ci.
- Détails sur l'équipement utilisé pour contrôler la température et le taux d'humidité de la chambre ainsi que le débit d'air dans la chambre (réalisation d'une courbe d'étalonnage).
- Détails sur l'équipement utilisé pour recueillir les échantillons servant à déterminer les concentrations dans la chambre et la répartition granulométrique.
- Détails sur la méthode de chimie analytique utilisée et la méthode de validation (notamment rendement de récupération du produit chimique testé à partir du milieu d'échantillonnage).
- Méthode de randomisation utilisée pour l'assignation des animaux aux groupes d'essai et aux groupes témoins.
- Détails sur la qualité de la nourriture et de l'eau (notamment origine/type de régime alimentaire, origine de l'eau).
- Détails de la méthodologie utilisée pour analyser le LLBA et pour mesurer la charge pulmonaire.

Résultats

- Tableau présentant la température, le taux d'humidité et le débit d'air dans les chambres d'inhalation.
- Tableau des concentrations cibles, nominales et réelles dans les chambres d'inhalation.

- Pour les atmosphères d'aérosols ayant un diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM) $> 1 \mu\text{m}$ (particules fines), on indiquera la distribution granulométrique selon le diamètre aérodynamique, ainsi que le DAMM et son écart type géométrique (σ_g). Pour les aérosols constitués principalement de particules $< 100 \text{ nm}$, on indiquera la distribution selon le diamètre thermodynamique équivalent, ainsi que le diamètre médian en nombre (DMN) et son écart type géométrique (σ_g). Pour les aérosols comportant une part significative de particules nanométriques et de particules de plus grande dimension, des données seront requises afin de caractériser complètement l'aérosol. Pour un tel aérosol la fraction de particules $< 100 \text{ nm}$ doit être indiquée.
- Tableau de données sur les réponses et le niveau de concentration pour chaque animal (c'est-à-dire nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, y compris de mortalité, et nature, sévérité, moment d'apparition et durée des effets).
- Tableau du poids de chacun des animaux.
- Tableau de la consommation de nourriture.
- Tableau des résultats de pathologie clinique.
- Tableau des résultats des lavages bronchoalvéolaires (LBA).
- Tableau des mesures de la charge pulmonaire, lorsqu'elle est mesurée.
- Tableau des données relatives à la fonction pulmonaire et des températures corporelles, lorsqu'elles sont mesurées.
- Poids des organes, pathologies macroscopiques et observations histopathologiques pour chaque animal, s'il y a lieu.
- Résultats des évaluations optionnelles de toxicité systémique (effets immunotoxiques, neurotoxiques, hépatotoxiques et cardiovasculaires, par exemple).

Discussion et interprétation des résultats

- Un effort particulier est consacré à la description des méthodes utilisées pour répondre aux critères de la présente Ligne directrice.
- La respirabilité des particules sera examinée à la lumière des résultats d'ensemble, en particulier si les critères de taille des particules (DAMM) n'ont pas pu être remplis.
- La cohérence des méthodes utilisées pour déterminer les concentrations nominales et réelles, et la relation entre concentrations réelles et concentrations nominales, sont incluses dans l'appréciation d'ensemble de l'étude.
- La cause probable de la mort et le mode d'action prédominant (systémique ou local) sont abordés.
- Une explication est apportée s'il a fallu euthanasier des animaux qui souffraient ou montraient des signes de détresse sévère et persistante, en se basant sur les critères du document d'orientation de l'OCDE sur les effets mesurés éthiquement acceptables (5).
- Le ou les organes cibles sont identifiés.

- La concentration repère, la CSENO et la CMENO sont déterminées.
- Description de toute complication survenue au cours de l'étude principale et pouvant avoir un impact sur les résultats de l'étude.
- Le cas échéant, une justification détaillée pour l'inclusion, la conception et la méthodologie des déterminations de la charge pulmonaire post-exposition.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) OECD (2009), Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 39, [ENV/JM/MONO\(2009\)28](#), OECD, Paris.
- 2) OCDE (1981), Toxicité subchronique par inhalation, Ligne directrice No 413 d'origine, Direction de l'environnement, OCDE, Paris.
- 3) OCDE (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, OECD, Paris.
- 4) OECD (2012). Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 36, OECD, Paris. No. 36, OECD, Paris. OECD, Paris
- 5) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 19, [ENV/JM/MONO\(2000\)7](#), OECD, Paris.
- 6) Dungworth, D.L., Tyler, W.S., and Plopper, C.E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.
- 7) OECD (2010). Guidance document on histopathology for inhalation toxicity studies supporting TG 413 (subchronic inhalation toxicity: 90 day study) and TG 413 (subchronic inhalation toxicity: 90-day study). Publications Hygiène et Sécurité de l'environnement – Série sur les essais et évaluations n° 125. [ENV/JM/MONO\(2010\)16](#), OECD, Paris.
- 8) Young J.T. (1981) Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1, 309-312.
- 9) Harkema J.R. (1990) Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85, 231-238.
- 10) Woutersen R.A., Garderen-Hoetmer A. van, Slootweg P.J. and Feron V.J. (1994) Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.
- 11) Mery S., Gross E.A., Joyner D.R., Godo M. and Morgan K.T. (1994) Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22, 353-372.
- 12) Kuper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M.H., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., Breda Vriesman van P.J.C. and Sminia T. (1992) The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13, 219-224.

- 13) Kuper C.F., Arts J.H.E. and Feron V.J. (2003) Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141, 281-285.
- 14) Lewis D.J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3). 419-428.

ANNEXE - Schémas d'essai pour la LD 413¹

LD 413 Option A - Gaz, vapeurs, aérosols liquides, et aérosols solides solubles

Examen de l'étude principale à l'intervalle post-exposition 1 (IPE-1) et dans les groupes satellite s à IPE-2: <ul style="list-style-type: none"> • Observations cliniques • Mesures de poids corporel • Consommation nourriture/eau • Pathologie clinique • Pathologie macroscopique/poids des organes • Poids poumon- poumon gauche • Histopathologie- poumon gauche • Analyse du liquide de lavage bronchoalvéolaire- poumon droit 	Niveaux de traitement	Etude principale	Groupe Satellite	Nombre total d'animaux
			IPE-1	IPE-2
	0	HP (PG) + LLBA (PD) 10 f/10 m	HP (PG) + LLBA (PD) 5 f/5 m	
	C ₁	HP (PG) + LLBA (PD) 10 f/10 m	HP (PG) + LLBA (PD) 5 f/5 m	
	C ₂	HP (PG) + LLBA (PD) 10 f/10 m	HP (PG) + LLBA (PD) 5 f/5 m	
	C ₃	HP (PG) + LLBA (PD) 10 f/10 m	HP (PG) + LLBA (PD) 5 f/5 m	
		$\Sigma = 80$	$\Sigma = 40$	$\Sigma = 120$

Rouge = Doit être fait
Vert = Optionel

Abbréviations:

- | | |
|---|---|
| 0 = groupe témoin | f = femelle |
| C _x = concentration d'exposition | m = mâle |
| LBA = Lavage bronchoalvéolaire | IPE = intervalle post-exposition |
| HP = histopathologie | IPE-1 = intervalle d'un jour post-exposition |
| FP = fonction pulmonaire | IPE-2 = intervalle de x semaine(s) post-exposition |
| PG = poumon gauche | IPE-3 = intervalle de y semaine(s) post-exposition (IPE-3 peut être avant ou après IPE-2) |
| PD = poumon droit | AD = à déterminer |

Note: Une étude principale réussie dépend des informations collectées dans l'étude préliminaire de détermination de la gamme de concentrations. Tous les produits chimiques testés ont recours à l'option A, à l'exception des aérosols solides faiblement solubles, pour lesquelles il faut utiliser l'option B. Le Document d'orientation No. 39 décrit la façon dont le directeur d'étude peut adapter ces deux options en vue d'optimiser l'évaluation du danger d'un produit chimique.

LD 413 Option B – aérosols solides faiblement solubles

Examens effectués dans l'étude principale:	Niveaux de traitements	Etude principale		Nombre total d'animaux	
IPE-1 (f et m): <ul style="list-style-type: none"> • Observations cliniques • Mesures de poids corporel • Consommation nourriture/eau • Pathologie clinique • Pathologie macroscopique/poids des organes • Poids poumon- poumon gauche (m et f) • Histopathologie- poumon gauche (m et f) • Analyse du liquide de lavage bronchoalvéolaire- poumon droit (m et f) 		PEO-1			
	0	HP (PG) + LLBA (PD) 10 f/10 m	FP (PD) (+ AD) 5 m		
	C ₁	HP (PG) + LLBA (PD) 10 f/10 m	FP (PD) (+ AD) 5 m		
	C ₂	HP (PG) + LLBA (PD) 10 f/10 m	FP (PD) (+ AD) 5 m		
	C ₃	HP (PG) + LLBA (PD) 10 f/10 m	FP (PD) (+ AD) 5 m		
		$\Sigma = 80$	$\Sigma = 20$	$\Sigma = 100$	
IPE-1 (groupe satellite, m seuls): <ul style="list-style-type: none"> • Fonction pulmonaire - poumon droit • Autres paramètres à déterminer (AD) par le directeur d'étude 					
Examens effectués dans les groupes satellites à l'IPE-2 et/ou l'IPE-3¹:		Goupes Satellites²		Nombre total d'animaux	
		IPE-2			IPE-3
	0	HP (PG) + LLBA (PD) 5 f	HP (PG) + LLBA (PD) 5 m	FP (PD) (+ AD) 5 m	
	C ₁	HP (PG) + LLBA (PD) 5 f	HP (PG) + LLBA (PD) 5 m	FP (PD) (+ AD) 5 m	
	C ₂	HP (PG) + LLBA (PD) 5 f	HP (PG) + LLBA (PD) 5 m	FP (PD) (+ AD) 5 m	
C ₃	HP (LL) + BAL (RL) 5 f	HP (LL) + LB (RL) 5 m	LB (RL) (+ TBD) 5 m		
		$\Sigma = 40$	$\Sigma = 20$	$\Sigma = 60$	

Rouge = Doit être fait
Vert = Optionnel

Note: 1 La nécessité de groupes satellites supplémentaires à l'IPE-2 et/ou l'IPE-3, la durée de l'intervalle post-exposition, et le placement dans le temps des intervalles post-exposition sont déterminés par le directeur de l'étude sur la base d'informations telles que le but de l'étude et les résultats.