

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

Toxicocinétique

INTRODUCTION

1. Les études portant sur la toxicocinétique d'une substance chimique ont pour objet de fournir des informations adéquates sur l'absorption, la distribution, la biotransformation (c'est-à-dire le métabolisme) et l'excrétion de cette substance, de faciliter l'établissement d'une relation entre la concentration ou la dose et la toxicité observée, et d'aider à comprendre le mécanisme de toxicité. La toxicocinétique peut aider à comprendre les études de toxicologie en démontrant que l'exposition des animaux d'expérience à la substance d'essai est de nature systémique, et en révélant quels sont les éléments circulants (substance mère/métabolites). Les principaux paramètres toxicocinétiques tirés de ces études fourniront également des renseignements sur le potentiel d'accumulation de la substance d'essai dans les tissus et/ou organes, et sur le risque d'induction d'une biotransformation sous l'effet d'une exposition à cette substance.
2. Les données toxicocinétiques peuvent aider à évaluer l'adéquation et la pertinence des données de toxicité animale, à des fins d'extrapolation des dangers pour l'homme et/ou d'évaluation des risques. De plus, les études de toxicocinétique peuvent apporter des informations utiles pour déterminer les doses à utiliser dans les études de toxicité (cinétique linéaire vs non linéaire), et les effets liés à la voie d'administration, la biodisponibilité et autres aspects relatifs à la conception de l'étude. Certains types de données toxicocinétiques peuvent servir à élaborer des modèles toxicocinétiques à base physiologique (TCBP).
3. Les données sur la toxicocinétique et le métabolisme présentent de l'intérêt à plusieurs titres. Elles peuvent notamment indiquer les toxicités et modes d'action éventuels, ainsi que leur relation aux doses et à la voie d'exposition. En outre, les données sur le métabolisme peuvent apporter des informations utiles pour évaluer l'importance, sur le plan toxicologique, de l'exposition à des métabolites exogènes de la substance d'essai.
4. Des données toxicocinétiques adéquates aideront à confirmer l'acceptabilité et l'applicabilité des méthodes fondées sur les relations quantitatives structure-activité, les prévisions à partir de données croisées sur de substances analogues ou le regroupement des substances pour évaluer la sécurité des produits chimiques. Les données de cinétique peuvent aussi servir à évaluer la pertinence toxicologique d'autres études (par exemple *in vivo/in vitro*).
5. Sauf mention contraire (voir en particulier les paragraphes 74 à 78), la présente Ligne directrice suppose l'administration orale de la substance d'essai.

© OCDE, (2010).

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

6. Les autorités compétentes ont des exigences et des besoins différents quant aux effets et paramètres toxicocinétiques à mesurer pour différentes classes de produits chimiques (par exemple pesticides, biocides, produits industriels). Contrairement à la plupart des autres Lignes directrices (LD), celle-ci décrit des essais de toxicocinétique impliquant des mesures et des effets observés multiples. À l'avenir, plusieurs nouvelles Lignes directrices et/ou document(s) d'orientation pourraient être élaborés pour décrire séparément et plus en détail chaque effet mesuré. Dans le cas de la présente Ligne directrice, les exigences et/ou besoins de chaque autorité compétente décident de la méthode d'essai ou de l'évaluation à mettre en œuvre.

7. De nombreuses études peuvent être réalisées pour évaluer à des fins réglementaires le comportement toxicocinétique d'un produit chimique. Néanmoins, en fonction des besoins ou des situations réglementaires particulières, toutes ces études ne sont pas nécessaires à l'évaluation d'un produit. Dans la conduite des études de toxicocinétique, il faut faire preuve de souplesse et prendre en considération les caractéristiques de la substance étudiée. Dans certains cas, l'étude d'une série précise de questions peut suffire à cerner les dangers et les risques associés à la substance. Parfois, les données toxicocinétiques peuvent être collectées dans le cadre d'une évaluation relevant d'autres études toxicologiques. Dans d'autres cas, il peut être nécessaire de réaliser des études de toxicocinétique supplémentaires et/ou plus approfondies, si la réglementation en vigueur l'exige et/ou lorsque l'évaluation chimique soulève de nouvelles interrogations.

8. Avant de lancer une étude, et pour en améliorer la qualité et éviter une utilisation non nécessaire d'animaux, le laboratoire d'essai prend en compte toutes les informations disponibles sur la substance à tester et sur ses métabolites et analogues pertinents. Parmi ces informations pourront figurer des données obtenues grâce à d'autres méthodes d'essai appropriées (études *in vivo*, *in vitro*, et/ou évaluations *in silico*). Les propriétés physicochimiques, comme le coefficient de partage octanol-eau ($\log P_{OE}$), le pK_a , l'hydrosolubilité, la pression de vapeur et le poids moléculaire d'un produit chimique, peuvent être utiles pour planifier l'étude et interpréter ses résultats. Les méthodes décrites à cet effet dans les différentes Lignes directrices de l'OCDE permettront de les déterminer.

LIMITATIONS

9. La présente Ligne directrice ne vise pas les cas particuliers, comme les femelles gravides ou en lactation et leur progéniture, ni l'évaluation de la présence éventuelle de résidus chez des animaux exposés servant à l'alimentation. Néanmoins, les données obtenues à l'issue d'une étude menée selon la LD 417 peuvent fournir des informations susceptibles d'orienter la conception d'études spécifiques sur ces sujets. La présente Ligne directrice n'est pas destinée aux essais de nanomatériaux. L'examen préliminaire des Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques en vue d'évaluer leur applicabilité aux nanomatériaux indique en effet que la LD 417 peut ne pas s'appliquer à ces derniers (1).

DÉFINITIONS

10. Les définitions utilisées aux fins de la présente Ligne directrice figurent en annexe.

CONSIDÉRATIONS RELATIVES AU BIEN-ÊTRE DES ANIMAUX

11. On trouvera dans le document d'orientation de l'OCDE n° 19 (2) des indications concernant le traitement éthiquement acceptable des animaux. La consultation de ce document est recommandée pour toutes les études *in vivo* et *in vitro* décrites dans la présente Ligne directrice.

DESCRIPTION DES MÉTHODES

Études pilotes

12. Pour le choix des paramètres expérimentaux s'appliquant aux études de toxicocinétique (par exemple métabolisme, bilan massique, protocoles analytiques, dosage, exhalation de CO₂, etc.), il est recommandé et conseillé de recourir à des études pilotes. La caractérisation de ces paramètres ne nécessite pas systématiquement l'emploi de substances radiomarquées.

Sélection des animaux

Espèces

13. Les espèces (et souches) animales utilisées pour les essais de toxicocinétique sont de préférence les mêmes que celles employées dans d'autres études toxicologiques réalisées avec la substance d'essai concernée. C'est normalement le rat qui est retenu, puisque les études toxicologiques l'utilisent massivement. Le recours à d'autres espèces, à la place ou en complément, est légitime si des études toxicologiques majeures indiquent des effets toxiques significatifs sur ces espèces, ou s'il est démontré que le comportement de ces dernières en termes de toxicité/toxicocinétique est plus pertinent pour l'homme. Il conviendra de justifier le choix de l'espèce animale et de la souche.

14. Sauf mention contraire, la présente Ligne directrice suppose le rat comme espèce d'essai. Certains aspects de cette Ligne directrice pourraient devoir être modifiés en cas de recours à une autre espèce.

Âge et souche

15. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes en bonne santé, âgés normalement de 6 à 12 semaines au moment de l'administration de la dose (voir également les paragraphes 13 et 14). L'utilisation d'animaux autres que des jeunes adultes fait l'objet de justification. Tous les animaux ont à peu près le même âge au début de l'étude. Les écarts de poids entre individus ne dépassent pas $\pm 20\%$ du poids moyen du groupe d'essai. Idéalement, la souche utilisée est la même que celle employée pour constituer la base de données toxicologiques concernant la substance chimique.

Nombre et sexe des animaux

16. Pour chaque dose testée, au minimum quatre animaux de même sexe sont utilisés. Il convient de justifier le sexe des animaux employés. L'utilisation d'animaux des deux sexes (quatre mâles et quatre femelles) est envisagée s'il existe des éléments attestant de différences de toxicité notables en fonction du sexe.

Conditions d'hébergement et d'alimentation

17. Les animaux sont en général placés dans des cages individuelles pendant la période d'essai. L'encagement collectif se justifie dans des circonstances particulières. L'éclairage est artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. La température de l'animalerie d'expérience est de 22 °C (± 3 °C) et l'humidité relative de 30 à 70 %. L'alimentation pourra comporter une nourriture classique de laboratoire et de l'eau à satiété.

Substance d'essai

18. Une substance d'essai radiomarquée au ^{14}C est utilisée pour tous les aspects de l'étude concernant le bilan massique et l'identification des métabolites; néanmoins, s'il peut être démontré:

- qu'il est possible d'évaluer correctement le bilan massique et de procéder à l'identification des métabolites à l'aide d'une substance d'essai non marquée; et
- que la spécificité et la sensibilité analytiques de la méthode utilisant une substance d'essai non radioactive sont égales ou supérieures à celles qu'on obtiendrait avec une substance radiomarquée,

alors il n'est pas nécessaire de recourir à un composé radiomarqué. Par ailleurs, d'autres isotopes radioactifs et stables peuvent être employés, en particulier si l'élément en question cause la toxicité ou fait partie de la portion toxique du composé. Si possible, le marqueur radioactif se situe dans une portion centrale métaboliquement stable (c'est-à-dire qui n'est pas échangeable, n'est pas éliminée par métabolisme sous forme de CO_2 , et n'est pas incorporée dans l'ensemble des radicaux monocarbonés de l'organisme) de la molécule. Le marquage de sites multiples ou de régions spécifiques de la molécule peut être nécessaire pour suivre le devenir métabolique du composé.

19. Les substances d'essai radiomarquées et non radiomarquées sont analysées à l'aide de méthodes appropriées permettant d'établir leur pureté et leur identité. La radiopureté de la substance d'essai radioactive est la meilleure qu'on puisse obtenir pour une substance donnée (dans l'idéal, elle est supérieure à 95 %) et un effort raisonnable est fourni pour identifier les impuretés présentes à hauteur de 2 % ou plus. La pureté ainsi que l'identité et la proportion des éventuelles impuretés identifiées sont incluses dans le rapport d'essai. Certains programmes réglementaires peuvent choisir de fournir des orientations supplémentaires pour aider à définir et à spécifier les substances d'essai composées de mélanges, ainsi que les méthodes de détermination de la pureté.

*Choix des doses**Étude pilote*

20. Le plus souvent, une dose orale unique suffit pour l'étude pilote. La dose est non toxique, mais suffisamment élevée pour permettre l'identification des métabolites dans les excréta (et, le cas échéant, dans le plasma), ainsi que pour remplir l'objectif assigné à l'étude pilote au paragraphe 12 de la présente Ligne directrice.

Études principales

21. Pour les études principales, il est préférable d'administrer un minimum de deux doses, car les informations réunies à partir d'au moins deux groupes de dose peuvent faciliter la détermination des doses pour d'autres études de toxicité, ainsi que l'évaluation de la relation dose-effet d'essais de toxicité déjà disponibles.

22. Lorsque deux doses sont administrées, elles sont toutes deux suffisamment élevées pour permettre l'identification des métabolites dans les excréta (et, le cas échéant, dans le plasma). Les informations tirées des études de toxicité disponibles sont prises en compte pour le dosage. Si l'on ne dispose pas d'informations (provenant, par exemple, d'études de toxicité orale aiguë indiquant des signes cliniques de toxicité, ou d'études de toxicité par doses répétées), on peut envisager pour la dose la plus élevée une valeur inférieure à l'estimation de la DL50 (voies orale et cutanée) ou de la CL50 (voie par

inhalation), ou inférieure à la valeur basse de la plage des estimations de toxicité aiguë. La dose la plus faible correspondra à une fraction de la dose la plus élevée.

23. Si un seul dosage est utilisé, la dose est idéalement suffisamment élevée pour permettre l'identification des métabolites dans les excréta (et, le cas échéant, dans le plasma), sans pour autant produire de toxicité apparente. Il convient de justifier la décision de ne pas inclure un second niveau de dose.

24. Si l'on a besoin de déterminer l'effet de la dose sur les processus cinétiques, deux doses peuvent ne pas suffire et il convient qu'au moins une dose soit assez élevée pour saturer ces processus. Si l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps [area under the plasma concentration-time curve] (AUC) ne varie pas de façon linéaire entre deux niveaux de dose utilisés dans l'étude principale, on peut en déduire que la saturation d'un ou de plusieurs des processus cinétiques s'opère quelque part entre ces deux niveaux de dose.

25. Pour les substances d'essai faiblement toxiques, il convient d'employer une dose maximale de 1 000 mg/kg de poids corporel (voies orale et cutanée) – si l'administration se fait par inhalation, se référer à la LD 403 de l'OCDE; généralement la dose n'excédera pas 2 mg/l. Des considérations spécifiques au produit peuvent rendre nécessaire une dose supérieure, en fonction des besoins réglementaires. Le choix des doses fait toujours l'objet d'une justification.

26. Les données relatives à la toxicocinétique ou à la distribution tissulaire fondées sur une dose unique peuvent convenir pour déterminer le potentiel d'accumulation et/ou de persistance. Néanmoins, dans certaines circonstances, l'administration de doses répétées peut être nécessaire i) pour mieux évaluer le potentiel d'accumulation et/ou de persistance, ou l'évolution des paramètres toxicocinétiques (par exemple induction et inhibition enzymatiques), ou ii) pour répondre aux exigences de l'autorité compétente. Dans les études à doses répétées, si l'administration de doses faibles suffit généralement, il peut parfois s'avérer nécessaire d'administrer des doses élevées (voir également le paragraphe 57).

Administration de la substance d'essai

27. La substance d'essai est dissoute ou mise en suspension homogène dans le même véhicule que celui employé pour les autres études de toxicité par gavage oral réalisées avec la substance d'essai, si des informations sont disponibles à ce sujet. Le choix du véhicule fait l'objet d'une justification. Le choix du véhicule et le volume de dosage sont pris en compte lors de la conception de l'étude. La méthode d'administration classique est le gavage; néanmoins, l'administration de la substance dans une capsule de gélatine ou mélangée à la nourriture peut être avantageuse dans certaines situations (dans les deux cas, le choix fait l'objet d'une justification). Il convient en outre de vérifier la dose effectivement administrée à chaque animal.

28. Le volume maximal de liquide à administrer par gavage oral en une seule fois dépend de la taille des animaux d'expérience, du type de véhicule de dosage, et de la suppression ou du maintien de la nourriture avant l'administration de la substance d'essai. La décision de maintenir ou de restreindre l'alimentation avant l'administration de la dose fait l'objet d'une justification. Normalement, le volume est aussi faible que possible, que le véhicule employé soit aqueux ou non. Pour les rongeurs, le volume de dose ne dépasse pas normalement 10 ml/kg de poids corporel. Dans le cas de substances d'essai plus lipophiles, les volumes de véhicule utilisés peuvent être de 4 ml/kg de poids corporel ou plus. En cas de doses répétées, si le jeûne quotidien est contre-indiqué, il faut envisager des volumes de dose plus faibles (par exemple de 2 à 4 ml/kg de poids corporel). Si possible, l'utilisation de volumes de dose en accord avec ceux utilisés pour la substance d'essai dans des études orales par gavage est envisagée.

29. L'administration de la substance d'essai en intraveineuse (IV) et sa mesure dans le sang et/ou les excréta peuvent servir à déterminer la biodisponibilité ou l'absorption orale relative. Pour ce type d'étude, une dose unique de la substance d'essai (généralement équivalente, mais non supérieure, à la dose orale la plus faible – voir « Choix des doses ») est administrée à l'aide d'un véhicule approprié. Cette dose est administrée dans un volume idoine (par exemple 1 ml/kg de poids corporel) et au site choisi, à au moins quatre animaux du sexe approprié (des animaux des deux sexes peuvent être employés s'il y a lieu, voir paragraphe 16). L'administration intraveineuse de la substance d'essai suppose de préparer une dose intégralement dissoute ou mise en suspension. On fera en sorte que le véhicule choisi pour cette administration n'interfère pas avec le flux sanguin ou l'intégrité des cellules sanguines. Si la substance est perfusée, la vitesse de perfusion est consignée et normalisée pour tous les animaux, à condition qu'une pompe à perfusion soit utilisée. Il convient de recourir à l'anesthésie en cas de canulation de la veine jugulaire (pour administrer le produit chimique et/ou faire un prélèvement sanguin) ou si l'on utilise l'artère fémorale pour l'administration. Le type d'anesthésie est mûrement réfléchi, car il peut avoir des conséquences toxicocinétiques. Les animaux doivent pouvoir se rétablir avant que la substance d'essai leur soit injectée.

30. D'autres voies d'administration, comme la voie cutanée et l'inhalation (voir paragraphes 74 à 78) peuvent également convenir pour certains produits chimiques, en fonction de leurs propriétés physicochimiques et des conditions d'utilisation ou de la voie d'exposition humaine prévisibles.

Mesures

Bilan massique

31. Le bilan massique est déterminé par la somme du pourcentage de la dose (radioactive) administrée excrétés dans l'urine, les fèces et l'air expiré, et du pourcentage présent dans les tissus, la carcasse résiduelle, et le liquide de lavage de la cage (voir paragraphe 46). En général, une récupération totale de plus de 90 % de la substance d'essai (radioactivité) administrée est considérée comme satisfaisante.

Absorption

32. Une estimation initiale de l'absorption peut être réalisée en excluant du bilan massique le pourcentage de la dose retrouvé dans le tractus gastro-intestinal et/ou dans les fèces. Pour le calcul du pourcentage d'absorption, voir le paragraphe 33. Pour l'analyse des excréta, voir les paragraphes 44 à 49. Si l'importance exacte de l'absorption faisant suite à l'administration d'une dose orale ne peut être établie à partir des études de bilan massique (par exemple, lorsque plus de 20 % de la dose administrée est présente dans les fèces), des explorations plus poussées peuvent être nécessaires. Elles peuvent comprendre soit 1) l'administration orale de la substance d'essai et la mesure de sa présence dans la bile, soit 2) l'administration orale et intraveineuse de la substance d'essai, et la mesure de la quantité nette de substance présente dans l'urine, plus dans l'air expiré, plus dans la carcasse pour chacune de ces deux voies. Dans les deux cas, la mesure de la radioactivité est utilisée comme méthode de substitution à l'analyse spécifique de la substance d'essai et de ses métabolites.

33. Pour étudier l'excrétion biliaire, on administre généralement la substance d'essai par voie orale. Dans ce type d'étude, les voies biliaires d'au moins quatre animaux du sexe approprié (ou des deux sexes le cas échéant) sont canulées et une dose unique de la substance d'essai est administrée. Après l'administration, il convient de surveiller aussi longtemps que nécessaire l'excrétion de radioactivité/substance d'essai dans la bile, afin d'estimer le pourcentage de la dose administrée excrété par cette voie, ce qui peut ensuite servir à calculer l'ampleur de l'absorption orale, de la manière suivante :

Pourcentage d'absorption = (quantités présentes dans la bile + l'urine + l'air expiré + la carcasse hors tractus gastro-intestinal) / quantité administrée x 100

34. Pour certaines classes de substances d'essai, une sécrétion directe de la dose absorbée peut avoir lieu au travers des membranes intestinales. Dans ce cas, la mesure du pourcentage de la dose présent dans les fèces après administration orale chez un rat aux voies biliaires canulées n'est pas jugée représentative de la dose non absorbée. Il est recommandé, si on prévoit une sécrétion intestinale, de calculer le pourcentage de la dose absorbé en estimant l'absorption par comparaison de l'excrétion après administration par voie orale et par voie intraveineuse (rat intact ou à voies biliaires canulées) (voir paragraphe 35). Il est également conseillé, quand la quantification de la sécrétion intestinale est jugée nécessaire, de mesurer l'excrétion chez le rat à voies biliaires canulées après administration intraveineuse de la dose.

Biodisponibilité

35. Il est possible de déterminer la biodisponibilité à partir de la cinétique plasmatique/sanguine des groupes oraux et IV, comme décrit aux paragraphes 50 à 52, par une analyse spécifique de la substance d'essai et/ou de son(s) métabolite(s) pertinent(s), c'est-à-dire sans qu'il soit besoin de recourir à une substance d'essai radiomarquée. Le calcul de la biodisponibilité (F) de la substance d'essai ou de son(s) métabolite(s) pertinents s'effectue alors comme suit :

$$F = (AUC_{\text{exp}} / AUC_{\text{IV}}) \times (\text{dose}_{\text{IV}} / \text{dose}_{\text{exp}})$$

où AUC est l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps et exp la voie d'administration (orale, cutanée ou par inhalation).

36. Afin d'évaluer les risques liés aux effets systémiques, on préfère généralement utiliser la biodisponibilité du composant toxique plutôt que le pourcentage d'absorption pour comparer les concentrations systémiques provenant d'études animales avec des données analogues de surveillance biologique tirées d'études sur l'exposition des travailleurs. La situation peut se complexifier si les doses se situent dans la plage non linéaire, aussi importe-t-il que l'étude de toxicocinétique détermine des doses dans la plage linéaire.

Distribution tissulaire

37. Connaître la distribution tissulaire d'une substance et/ou de ses métabolites est important pour identifier les tissus cibles, comprendre les mécanismes de toxicité à l'œuvre et obtenir des informations sur le potentiel d'accumulation et de persistance de la substance et de ses métabolites. Le pourcentage de dose (radioactive) totale dans les tissus et dans la carcasse résiduelle est mesuré au minimum à la fin de l'étude d'excrétion (par exemple normalement 7 jours après le dosage ou moins en fonction du comportement spécifique de la substance d'essai). Lorsqu'aucune substance n'est pas détectée dans les tissus à la fin de l'étude (par exemple parce que la substance peut avoir été éliminée avant la fin de l'étude en raison d'une courte demi-vie), il convient de prendre soin de ne pas mal interpréter les données. Dans ce type de situation, la distribution tissulaire est examinée au moment du pic de concentration plasmatique/sanguine (T_{max}) ou au maximum du taux d'excrétion urinaire de la substance d'essai (et/ou de ses métabolites) selon le cas, (voir paragraphe 38). De plus, il se peut que la collecte de tissus à d'autres moments soit nécessaire pour évaluer la variation de la distribution en fonction du temps (s'il y a lieu), pour aider à établir le bilan massique, et/ou si une autorité compétente l'exige. Parmi les tissus à prélever figurent le foie, la graisse, le tractus gastro-intestinal, le rein, la rate, le sang total, la carcasse résiduelle, les tissus des organes cibles et tout autre tissu potentiellement intéressant pour l'évaluation toxicologique de la substance d'essai, par exemple thyroïde, hématies, organes reproducteurs, peau, œil (en particulier pour les animaux pigmentés).

On envisagera d'analyser un plus large éventail de tissus aux mêmes moments afin d'optimiser l'utilisation des animaux et si des études de toxicité chronique ou subchronique mettent en évidence une toxicité pour certains organes cibles. Il convient également de consigner la concentration du résidu (radioactif) et les ratios tissu-plasma (sanguin).

38. Il est possible que l'évaluation de la distribution tissulaire à d'autres moments, tels qu'aux moments du pic de concentration plasmatique/sanguine (par exemple T_{max}) ou au maximum du taux d'excrétion urinaire, obtenue à partir des études de cinétique plasmatique/sanguine ou d'excrétion respectivement, soit aussi nécessaire ou exigée par une autorité compétente. Cette information peut être utile pour comprendre la toxicité et le potentiel d'accumulation et de persistance de la substance d'essai et des métabolites. Le choix des éléments à prélever fait l'objet d'une justification; les prélèvements destinés à être analysés sont généralement les mêmes que ceux énumérés au paragraphe 37.

39. Pour les études sur la distribution tissulaire, il est possible de quantifier la radioactivité en procédant à la dissection, l'homogénéisation, la combustion et/ou la solubilisation des organes, puis à un comptage par scintillation liquide des résidus piégés. Certaines techniques, actuellement à différents stades de développement, notamment l'autoradiographie quantitative du corps entier et l'autoradiographie microscopique des récepteurs, peuvent s'avérer utiles pour déterminer la distribution d'une substance d'essai dans les organes et/ou les tissus (3) (4).

40. Pour les voies d'administration autres que la voie orale, on prélève et analyse des tissus spécifiques, comme les poumons dans les études par inhalation ou la peau dans les études par voie cutanée. Voir les paragraphes 74 à 78.

Métabolisme

41. On recueille les excréta (et, le cas échéant, le plasma) afin d'identifier et de quantifier la substance d'essai et ses métabolites, non modifiés, selon la méthode indiquée aux paragraphes 44 à 49. Il est acceptable de regrouper les excréta pour faciliter l'identification des métabolites au sein d'un groupe de dose donné. Il est recommandé d'établir le profil des métabolites à chaque période de l'étude. Néanmoins, si l'absence d'échantillons ou de radioactivité empêche de le faire, il est acceptable de regrouper l'urine et les fèces recueillies à différents moments, mais provenant uniquement d'animaux du même sexe ayant reçu la même dose. Des méthodes qualitatives et quantitatives appropriées sont mises en œuvre pour étudier l'urine, les fèces et la radioactivité expirée par les animaux traités, ainsi que la bile, le cas échéant.

42. Un effort raisonnable est fait pour identifier tous les métabolites présents à hauteur de 5 % ou plus de la dose administrée et pour fournir un schéma métabolique de la substance d'essai. Il convient d'identifier les composés ayant été caractérisés, dans les excréta, comme comprenant 5 % ou plus de la dose administrée. L'identification équivaut à la détermination exacte de la structure des composants. Habituellement, l'identification est réalisée en soumettant simultanément à une chromatographie le métabolite et des étalons connus, en utilisant deux systèmes différents, ou grâce à des techniques à même de fournir une identification structurale positive, par exemple spectrométrie de masse, résonance magnétique nucléaire (RMN), etc. Dans le cas d'une co-chromatographie, il faut éviter d'utiliser des techniques chromatographiques employant la même phase stationnaire avec deux systèmes de solvants différents pour vérifier l'identité de métabolites, car alors les méthodes ne sont pas indépendantes. L'identification par co-chromatographie fait usage de deux systèmes dissemblables, analytiquement indépendants, par exemple une chromatographie sur couche mince (CCM) à phase inversée et une CCM à phase normale, ou une CCM et une chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Du moment que la qualité de la séparation chromatographique est acceptable, aucune confirmation supplémentaire par spectroscopie n'est demandée. Les méthodes qui apportent des informations structurales, telles que la chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (CG-SM), la chromatographie liquide/spectrométrie de

masse (CL-SM), ou la chromatographie liquide/spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM) et la spectrométrie par RMN, peuvent également fournir une identification non ambiguë.

43. S'il est impossible d'identifier les métabolites présents à hauteur de 5 % ou plus de la dose administrée, il convient de le justifier ou de l'expliquer dans le rapport final. Il peut être avisé d'identifier les métabolites représentant moins de 5 % de la dose administrée, afin de mieux comprendre la voie métabolique en vue d'évaluer les dangers et/ou les risques liés à la substance d'essai. Une confirmation de la structure de ces métabolites est autant que possible fournie. Pour cela, il pourra être nécessaire d'établir leur profil dans le plasma, le sang ou d'autres tissus.

Excrétion

44. Le taux et l'importance de l'excrétion de la dose administrée sont déterminés par la mesure du pourcentage de la dose (radioactive) retrouvé dans l'urine, les fèces et l'air expiré. Ces données aideront également à établir le bilan massique. Les quantités de substance d'essai (radioactivité) éliminées dans l'urine, les fèces et l'air expiré sont évaluées à des intervalles de temps appropriés (voir les paragraphes 47 à 49). Les expériences à doses répétées sont conçues de manière à permettre d'obtenir des données sur l'excrétion, afin de remplir les objectifs définis au paragraphe 26. On pourra ainsi effectuer des comparaisons avec les expériences à dose unique.

45. Si une étude pilote montre que la substance d'essai (radioactivité) n'est pas excrétée en quantités significatives (voir paragraphe 49) dans l'air expiré, il ne sera pas nécessaire de collecter celui-ci dans le cadre de l'étude définitive.

46. Chaque animal est placé, pour la collecte des excréta (urine, fèces et air expiré), dans une unité individuelle d'étude du métabolisme. À la fin de chaque période de collecte (voir paragraphes 47 à 49), ces unités sont rincées à l'aide d'un solvant approprié (lavage de la cage) pour assurer une récupération maximale de la substance d'essai (radioactivité). La collecte des excréta s'achève au bout de 7 jours, ou après récupération, avant ce délai, d'au moins 90 % de la dose administrée.

47. La quantité totale de substance (radioactivité) dans l'urine est déterminée à deux moments au moins de la première journée de collecte, dont une fois 24 h après l'administration de la dose, puis quotidiennement jusqu'à la fin de l'étude. Il est recommandé de retenir plus de deux points d'échantillonnage pendant la première journée (par exemple, 6 h, 12 h et 24 h après l'administration de la dose). Les résultats des études pilotes sont analysés afin d'obtenir des informations sur les moments de collecte alternatifs ou supplémentaires à mettre en œuvre. Le calendrier de collecte fait l'objet d'une justification.

48. La quantité totale de substance d'essai (radioactivité) dans les fèces est déterminée quotidiennement, 24 h après l'administration de la dose et jusqu'à la fin de l'étude, sauf si les études pilotes suggèrent d'effectuer des prélèvements plus fréquents ou à d'autres moments. Dans ce cas, une justification est fournie.

49. La collecte du CO₂ expiré et d'autres produits volatils peut être interrompue dans une étude donnée quand on retrouve moins de 1 % de la dose administrée dans l'air exhalé pendant 24 h de collecte.

Études en fonction du temps

Cinétique sanguine/plasmatique

50. Ces études visent à estimer les principaux paramètres toxicocinétiques [par exemple C_{max} , T_{max} , demi-vie ($t_{1/2}$), AUC] concernant la substance d'essai. Elles peuvent se mener à dose unique, mais impliquent généralement deux doses ou plus. Le dosage est à définir en fonction de la nature de l'expérience et/ou de la question étudiée. Des données cinétiques peuvent être nécessaires pour résoudre des questions comme la biodisponibilité de la substance et/ou déterminer l'effet de la dose sur l'élimination (c'est-à-dire pour établir si la saturation de l'élimination dépend ou non de la dose).

51. Pour ce type d'étude, il convient d'utiliser au moins quatre animaux du même sexe par groupe de dose. Le choix du sexe des animaux employés fait l'objet d'une justification. L'utilisation d'animaux des deux sexes (quatre mâles et quatre femelles) est envisagée s'il existe des éléments attestant de différences de toxicité notables en fonction du sexe.

52. Après l'administration de la substance d'essai (radiomarquée), il convient de prélever des échantillons de sang sur chaque animal, à des moments et selon une méthode appropriés. Le volume et le nombre des échantillons sanguins prélevés par animal sont susceptibles d'être limités par les effets éventuels de prélèvements répétés sur la santé/la physiologie des animaux et/ou par la sensibilité de la méthode analytique. Les échantillons seront analysés séparément pour chaque animal. Dans certaines circonstances (par exemple caractérisation des métabolites), il peut être nécessaire de regrouper les échantillons prélevés sur plusieurs animaux. Ces échantillons regroupés sont clairement identifiés, et le regroupement fait l'objet d'une explication. Si une substance radiomarquée est utilisée, il peut y avoir lieu d'analyser la radioactivité totale. Dans ce cas, l'analyse est effectuée dans le sang total et le plasma, ou dans le plasma et les globules rouges, pour permettre de calculer le rapport sang/plasma. Dans d'autres circonstances, il peut être nécessaire de procéder à une étude plus approfondie requérant l'identification du composé parent et/ou de ses métabolites, ou d'évaluer la fixation aux protéines.

Autres études de cinétique tissulaire

53. Ces études ont pour objet d'obtenir des informations sur l'évolution dans le temps afin de répondre à des questions liées notamment au mode d'action toxique, à la bioaccumulation et à la biopersistance en déterminant la concentration de la substance d'essai dans différents tissus. Le choix des tissus et le nombre de points temporels évalués dépendront de l'aspect étudié et de la base de données toxicologiques disponible sur la substance chimique. Pour concevoir ces études de cinétique tissulaire complémentaires, il convient de tenir compte des informations recueillies décrites aux paragraphes 37 à 40. Ces études peuvent nécessiter un dosage unique ou un dosage répété. La méthode retenue fait l'objet d'une justification détaillée.

54. Des études de cinétique tissulaire complémentaires peuvent être entreprises:

- lorsqu'on constate une demi-vie sanguine allongée, suggérant la possibilité d'une accumulation de la substance d'essai dans différents tissus; ou
- pour voir si un niveau d'état stationnaire a été atteint dans des tissus particuliers (dans des études à doses répétées, par exemple, même quand un niveau d'état stationnaire a apparemment été atteint dans le sang, il peut être utile de s'assurer qu'il en est de même dans les tissus cibles).

55. Pour ce type d'étude en fonction du temps, il convient d'administrer une dose orale appropriée de la substance d'essai à au moins quatre animaux par dose et par point temporel, et de surveiller l'évolution

dans le temps de la distribution dans les tissus choisis. À moins qu'une toxicité spécifique liée au sexe ait été observée, on emploiera des animaux d'un seul sexe. La question de savoir si l'analyse doit porter sur la radioactivité totale ou sur la substance mère et/ou ses métabolites dépendra du problème traité. La distribution tissulaire est évaluée à l'aide des techniques appropriées.

Induction/inhibition enzymatique

56. Des études sur les effets possibles de l'induction/inhibition enzymatique ou sur la biotransformation de la substance d'essai concernée peuvent être nécessaires dans l'un ou plusieurs des cas suivants :

1. lorsque des éléments indiquent une relation entre la biotransformation de la substance d'essai et l'augmentation de la toxicité;
2. lorsque les données de toxicité disponibles indiquent une relation non linéaire entre la dose et le métabolisme;
3. si les études sur l'identification des métabolites révèlent un métabolite potentiellement toxique qui pourrait être le produit d'une voie enzymatique induite par la substance d'essai;
4. pour expliquer des effets a priori liés à des phénomènes d'induction enzymatique;
5. si l'on observe des modifications toxicologiques importantes dans le profil métabolique de la substance d'essai, dans le cadre d'expériences *in vitro* ou *in vivo* menées sur différentes espèces ou dans différentes conditions, il peut être nécessaire de caractériser l'enzyme ou les enzymes impliquées (par exemple, des enzymes de phase I comme les isoenzymes constituant le système des mono-oxygénases à cytochrome P 450, des enzymes de phase II comme les isoenzymes de la sulfotransférase ou de l'uridine diphosphate glucuronosyltransférase, ou tout autre enzyme pertinente). Ces informations peuvent servir à évaluer la pertinence des extrapolations interspèces.

57. Pour évaluer les variations toxicocinétiques liées à la substance d'essai, il convient de mettre en œuvre des protocoles d'étude adéquats, convenablement validés et justifiés. Ces études peuvent par exemple consister à administrer des doses répétées d'une substance d'essai non marquée, puis une dose unique radiomarquée le 14^e jour, ou des doses répétées d'une substance d'essai radiomarquée et des échantillonnages les 1^{er}, 7^e et 14^e jours pour déterminer le profil des métabolites. L'administration de doses répétées d'une substance d'essai radiomarquée peut également fournir des renseignements sur la bioaccumulation (voir paragraphe 26).

MÉTHODES COMPLÉMENTAIRES

58. Outre les expériences *in vivo* décrites dans la présente Ligne directrice, des méthodes complémentaires peuvent fournir des informations sur l'absorption, la distribution, le métabolisme ou l'élimination d'une substance chimique chez certaines espèces.

Utilisation d'informations in vitro

59. Plusieurs aspects concernant le métabolisme de la substance peuvent être étudiés dans le cadre d'études *in vitro* faisant appel à des systèmes d'essai appropriés. Des hépatocytes fraîchement isolés ou en culture et des fractions subcellulaires (par exemple microsomes et cytosol ou fraction S9) du foie peuvent servir à étudier les métabolites possibles. Le métabolisme local dans l'organe cible, par exemple le

poumon, peut être intéressant pour l'évaluation des risques. À cette fin, les fractions microsomaux des tissus cibles peuvent être utiles. Les études sur microsomes peuvent permettre de traiter les différences potentielles entre les sexes et selon les stades de la vie, et de caractériser les paramètres enzymatiques (K_m et V_{max}) qui peuvent aider à évaluer la dose-dépendance du métabolisme en lien avec les niveaux d'exposition. En outre, les microsomes peuvent permettre d'identifier les enzymes microsomaux impliquées dans le métabolisme de la substance qui peuvent servir pour l'extrapolation inter-espèces (voir aussi paragraphe 56). On peut également examiner le potentiel d'induction de la biotransformation à l'aide de fractions subcellulaires du foie (par exemple, microsomes et cytosol) d'animaux prétraités par la substance concernée, par le biais d'études *in vitro* d'induction sur les hépatocytes, ou à partir de lignées cellulaires spécifiques exprimant des enzymes pertinentes. Dans certaines circonstances et certaines conditions, on peut envisager d'utiliser des fractions subcellulaires provenant de tissus humains, afin de déterminer les éventuelles différences entre espèces en matière de biotransformation. Les résultats d'études *in vitro* peuvent également servir à l'élaboration de modèles toxicocinétiques à base physiologique (TCBP) (5).

60. Les études d'absorption cutanée *in vitro* peuvent fournir des renseignements supplémentaires pour caractériser l'absorption (6).

61. Des cultures primaires de cellules hépatiques et des coupes de tissus frais peuvent être utilisées pour répondre aux mêmes questions que les microsomes hépatiques. Dans certains cas, il est possible de répondre à certaines questions en utilisant des lignées cellulaires exprimant spécifiquement l'enzyme pertinente ou des lignées cellulaires génétiquement modifiées. Il peut aussi être utile d'étudier l'inhibition et l'induction d'isoenzymes particulières du cytochrome P450 (par exemple CYP1A1, 2E1, 1A2, etc.) et/ou d'enzymes de phase II par le composé parent dans le cadre d'essais *in vitro*. Les informations obtenues peuvent présenter de l'intérêt pour des composés de structure proche.

Utilisation des données toxicocinétiques provenant d'études de toxicité

62. L'analyse des échantillons de sang, de tissus et/ou d'excréta obtenus au cours d'autres études de toxicité peut fournir des données sur la biodisponibilité, l'évolution de la concentration plasmatique dans le temps (AUC, C_{max}), le potentiel de bioaccumulation, les taux d'élimination et les variations métaboliques et cinétiques liées au sexe ou au stade de vie.

63. Le plan d'étude peut aussi être adapté pour répondre à des questions concernant la saturation de l'absorption, les voies de biotransformation ou d'excrétion à des doses plus élevées, l'emprunt de nouvelles voies métaboliques à des doses plus élevées, ou la limitation des métabolites toxiques à des doses plus élevées.

64. D'autres aspects liés à l'évaluation des dangers peuvent aussi être abordés, notamment:

- la sensibilité en fonction de l'âge, qui dépend de l'état de la barrière hémato-encéphalique, des reins et/ou des capacités de détoxification;
- la sensibilité de certaines sous-populations due à des différences de capacité de biotransformation ou à d'autres différences toxicocinétiques;
- l'ampleur de l'exposition du fœtus par transfert transplacentaire des produits chimiques ou de celle du nouveau-né par le biais de la lactation.

Utilisation de modèles toxicocinétiques

65. Les modèles toxicocinétiques peuvent contribuer à différents aspects de l'évaluation des dangers et des risques, par exemple à la prévision de l'exposition systémique et de la dose délivrée aux tissus internes. En outre, pour aborder des questions particulières portant sur le mode d'action, ces modèles peuvent servir de base à l'extrapolation entre espèces, entre voies d'exposition, entre dosages, et à des fins d'évaluation des risques pour l'homme. Les données utiles à l'élaboration de modèles TCBP pour une substance chimique d'une espèce quelconque sont 1) les coefficients de partage, 2) les constantes biochimiques et paramètres physiologiques, 3) les paramètres d'absorption des différentes voies d'exposition et 4) les données cinétiques *in vivo* pour l'évaluation des modèles (par exemple paramètres d'élimination pour les voies d'excrétion pertinentes (> 10 %), K_m et V_{max} pour le métabolisme). Les données expérimentales utilisées pour élaborer le modèle sont obtenues par des méthodes scientifiquement valables, et les résultats du modèle sont validés. Les paramètres spécifiques au produit ou à l'espèce, comme le taux d'absorption, le coefficient de partage sang-tissu et les constantes de vitesse métabolique, sont souvent déterminés pour faciliter l'élaboration de modèles non compartimentaux ou à base physiologique (7).

RÉSULTATS ET RAPPORT

66. Il est recommandé de faire figurer une table des matières dans le rapport d'essai.

Corps du rapport

67. Le corps du rapport présente les informations décrites par la présente Ligne directrice, organisées en sections et paragraphes de la manière suivante:

Résumé

68. Cette section du rapport d'étude résume la conception de l'étude et décrit les méthodes utilisées. Elle met également en relief les principaux résultats concernant le bilan massique, la nature et l'importance des métabolites, les résidus tissulaires, le taux d'élimination, le potentiel de bioaccumulation, les différences liées au sexe, etc. Ce résumé est suffisamment détaillé pour permettre une évaluation des résultats.

Introduction

69. Cette section du rapport présente les objectifs de l'étude, les raisons l'ayant motivée et les principes de sa conception, ainsi que les références utiles et un historique permettant de la resituer.

Matériels et méthodes

70. Cette section du rapport décrit en détail toutes les informations pertinentes, notamment:

(a) Substance d'essai

Cette sous-section porte sur l'identification de la substance d'essai: nom chimique, structure moléculaire, détermination qualitative et quantitative de sa composition chimique, pureté chimique et, si possible, type et quantité des éventuelles impuretés. Elle comprend également des informations sur les propriétés physicochimiques de la substance, notamment: état physique, couleur, coefficient de solubilité et/ou de partage brut, stabilité et, éventuellement, corrosivité. Le cas échéant, des informations sont également

données sur les isomères. Si la substance d'essai est radiomarquée, cette sous-section renseigne sur le type de radionucléide, la position du marqueur, l'activité spécifique et la pureté radiochimique.

Il convient d'indiquer le type de véhicule, diluant, agent de suspension, émulsifiant ou autre matériau utilisé pour administrer la substance d'essai, ou d'en donner une description.

(b) Animaux d'expérience

Cette sous-section renseigne sur les animaux d'expérience, notamment: choix de l'espèce et de la souche et justification de ce choix, âge au début de l'étude, sexe, poids corporel, état de santé et conditions d'élevage.

(c) Méthodes

Cette sous-section décrit en détail la conception de l'étude et la méthode utilisée. Elle comprend les éléments suivants:

- (1) Justification des éventuelles modifications apportées à la voie ou aux conditions d'exposition, s'il y a lieu;
- (2) Justification du choix des niveaux de dose;
- (3) Description des éventuelles études pilotes utilisées pour la conception expérimentale des études de suivi. Les données à l'appui des études pilotes sont jointes;
- (4) Mode de préparation de la solution administrée et, le cas échéant, type de solvant ou de véhicule;
- (5) Nombre de groupes de traitement et nombre d'animaux par groupe;
- (6) Niveaux et volume des doses (et, si la radioactivité est utilisée, activité spécifique de la dose);
- (7) Voie(s) et méthodes d'administration;
- (8) Fréquence d'administration;
- (9) Période de jeûne (le cas échéant);
- (10) Radioactivité totale par animal;
- (11) Manipulation des animaux;
- (12) Collecte et traitement des échantillons;
- (13) Méthodes d'analyse utilisées pour la séparation, la quantification et l'identification des métabolites;
- (14) Limites de détection des méthodes employées;
- (15) Autres mesures et protocoles expérimentaux utilisés (notamment validation des méthodes d'essai pour l'analyse des métabolites);

(d) Analyse statistique

Si on recourt à l'analyse statistique pour dépouiller les résultats de l'étude, il convient d'apporter suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse et le logiciel employés pour qu'un examinateur/statisticien indépendant puisse réévaluer et reconstruire l'analyse.

Si on recourt à une modélisation systémique (par exemple à un modèle TCBP), la présentation du modèle employé comporte une description complète du modèle, afin qu'un expert indépendant puisse reconstruire et valider celui-ci (voir le paragraphe 65 et l'annexe des définitions).

Résultats

71. Toutes les données sont récapitulées et présentées sous forme de tableaux accompagnés d'une évaluation statistique appropriée, comme décrit dans la présente section. Les données résultant du comptage de la radioactivité sont récapitulées et présentées de manière appropriée à l'étude, généralement en microgrammes ou milligrammes d'équivalents par masse d'échantillon, mais d'autres unités peuvent être utilisées. Cette section comporte des graphiques illustrant les résultats, reproduit les données chromatographiques et spectrométriques représentatives, identifie/quantifie les métabolites et présente les voies métaboliques proposées, y compris la structure moléculaire des métabolites. En outre, les renseignements suivants figurent, le cas échéant, dans cette section :

- (1) Quantité et pourcentage de récupération de la radioactivité dans l'urine, les fèces, l'air expiré, ainsi que dans l'urine et les fèces récupérées lors du nettoyage de la cage:
 - Pour les études par voie cutanée, inclure également les données relatives à la récupération de la substance sur la peau traitée et lors du nettoyage cutané, les données sur la radioactivité résiduelle présente dans le dispositif couvrant la peau et l'unité d'étude du métabolisme, ainsi que les résultats de l'étude de nettoyage cutané; pour plus de précisions, voir les paragraphes 74 à 77;
 - Pour les études par inhalation, inclure également des données sur la récupération de la substance d'essai dans les poumons et dans les tissus nasaux (8); pour plus de précisions, voir le paragraphe 78;
- (2) Distribution tissulaire, en pourcentage de la dose administrée et en concentration (microgrammes d'équivalents par gramme de tissu) et ratios tissu/sang et tissu/plasma;
- (3) Bilan-matière élaboré pour chaque étude impliquant l'analyse des tissus et des excréta;
- (4) Concentrations plasmatiques et paramètres toxicocinétiques (biodisponibilité, AUC, C_{max} , T_{max} , élimination, demi-vie) après administration de la substance par la ou les voies d'exposition pertinentes;
- (5) Vitesse et importance de l'absorption de la substance d'essai après administration par la ou les voies d'exposition pertinentes;
- (6) Quantités de substance d'essai et de métabolites (en pourcentage de la dose administrée) collectées dans les excréta;
- (7) Référence aux données présentées en annexe, qui comprennent les données par animal pour tous les critères de mesure (par exemple administration de la dose, pourcentage de récupération, concentrations, paramètres toxicocinétiques, etc.);
- (8) Graphique représentant les voies métaboliques proposées et la structure moléculaire des métabolites.

Discussion et conclusions

72. Dans cette section, il convient pour le ou les auteurs de:

- (1) proposer une voie métabolique, en s'appuyant sur les résultats concernant le métabolisme et l'élimination de la substance d'essai;

(2) examiner les éventuelles différences potentielles liées à l'espèce ou au sexe concernant l'élimination et/ou la biotransformation de la substance d'essai;

(3) présenter dans un tableau et examiner l'identité et l'importance des métabolites, les taux d'élimination, le potentiel de bioaccumulation et le niveau des résidus tissulaires de la substance mère et/ou de ses métabolites, ainsi que les éventuelles modifications dose-dépendantes des paramètres toxicocinétiques, s'il y a lieu;

(4) intégrer à cette section toute donnée toxicocinétique pertinente obtenue au cours d'études de toxicité;

(5) formuler une conclusion succincte pouvant être étayée par les résultats de l'étude;

(6) ajouter des sections supplémentaires (si nécessaire ou opportun).

73. Les sections supplémentaires serviront à présenter des informations bibliographiques, tableaux, graphiques, annexes, etc.

AUTRES VOIES D'EXPOSITION

Voie cutanée

Traitement cutané

74. Cette section fournit des renseignements spécifiques sur les études de toxicocinétique par voie cutanée. Il convient de consulter la LD 427 « Absorption cutanée : méthode *in vivo* » (6) pour l'absorption cutanée. Pour d'autres effets observés, tels que la distribution et le métabolisme, cette Ligne directrice peut être utilisée. Pour le traitement par voie cutanée, on peut utiliser un ou plusieurs niveaux de dose. La substance d'essai (c'est-à-dire la préparation pure, diluée ou le mélange contenant la substance d'essai à appliquer sur la peau) est identique (ou représente un substitut réaliste) aux produits auxquels pourraient être exposés l'homme ou les autres espèces cibles potentielles. Le choix du ou des niveaux de dose s'effectue conformément aux indications des paragraphes 20 à 26 de la présente Ligne directrice. Parmi les facteurs à prendre en considération figurent l'exposition humaine potentielle et/ou les doses auxquelles une toxicité a été observée au cours d'autres études de toxicité cutanée. Si nécessaire, il convient de dissoudre la ou les doses cutanées dans un véhicule adéquat et de les appliquer dans un volume adapté à leur administration. Peu de temps avant l'essai, la fourrure de la région dorsale du tronc des animaux à tester est tondue. Le rasage peut être employé mais il est effectué environ 24 heures avant l'essai. Lorsque la fourrure est rasée ou tondue, cette opération s'effectue en évitant toute lésion de la peau qui pourrait entraîner une modification de sa perméabilité. Environ 10 % de la superficie corporelle sont dégagés pour application de la substance d'essai. Dans le cas de substances hautement toxiques, la zone couverte peut être plus petite, mais il convient de recouvrir une surface aussi large que possible d'une pellicule mince et uniforme. La surface de traitement utilisée est la même pour tous les groupes d'essai par voie cutanée. Les zones traitées sont recouvertes à l'aide d'une protection adaptée maintenue en place. Les animaux sont encagés séparément.

75. Une étude de nettoyage cutané est menée afin d'évaluer la quantité de la dose appliquée susceptible d'être retirée de la peau lors d'un lavage de la zone traitée au savon doux et à l'eau. Cette étude peut également aider à établir le bilan massique quand la substance d'essai est administrée par voie cutanée. Pour ce type d'étude, il convient d'appliquer une dose unique de la substance d'essai à deux animaux. Le niveau de dose est choisi conformément aux indications du paragraphe 23 de la présente Ligne directrice (voir également le paragraphe 76 à propos du temps de contact avec la peau). La quantité

de substance d'essai récupérée lors de ce lavage permet d'évaluer l'efficacité d'élimination de la substance d'essai par la procédure de nettoyage.

76. Sauf si sa corrosivité l'empêche, la substance d'essai est appliquée et maintenue sur la peau pendant un minimum de 6 heures. Une fois la protection retirée, la zone traitée est lavée selon la procédure décrite pour l'étude de nettoyage cutané (voir paragraphe 75). La protection et la solution ayant servi au nettoyage sont analysées à la recherche de résidus de la substance d'essai. À la fin de l'étude, les animaux sont euthanasiés conformément à (1), et la peau traitée est prélevée. Une section appropriée de la peau traitée est analysée pour déterminer la présence résiduelle de la substance (radioactivité).

77. Pour l'évaluation toxicocinétique des produits pharmaceutiques, des procédures différentes peuvent être nécessaires, en accord avec les autorités compétentes.

Inhalation

78. Pour ce type d'étude, on utilise une concentration unique de la substance d'essai, ou davantage si nécessaire. Le choix de la ou des concentrations s'effectue conformément aux indications des paragraphes 20 à 26 de la présente Ligne directrice. Les traitements par inhalation seront menés à l'aide d'un appareillage de type « cône nasal » ou « tête seule » pour empêcher l'absorption par d'autres voies d'exposition (8). Si d'autres méthodes d'exposition par inhalation sont retenues, il convient de justifier et de documenter ce choix. La durée d'exposition par inhalation est définie; elle est généralement comprise entre 4 et 6 heures.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) OCDE (2009), *Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials*, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OCDE, Paris.
- 2) OCDE (2000), *Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Série sur les essais et évaluations n° 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, Paris.
- 3) Solon E. G., Kraus L (2002), Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, *J Pharm and Tox Methods* 46, 73-81.
- 4) Stumpf, W. E. (2005), Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography, *J. Pharmacological and Toxicological Methods*, 51, 25-40.
- 5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008), Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. *Regulatory toxicology and pharmacology* 50, 400 – 411
- 6) OCDE (2004), *Absorption cutanée: méthode in vitro*, Ligne directrice No. 428, Lignes Directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- 7) IPCS (2010), *Characterizing and applying physiologically-based pharmacokinetic models in risk assessment*, Genève, Organisation mondiale de la santé, Programme international sur la sécurité des substances chimiques (sous presse).
- 8) OCDE (2009), *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Série sur les essais et évaluations n°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OCDE, Paris.
- 9) OCDE (2004), *Absorption cutanée: méthode in vivo*, Ligne directrice No. 427, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, OCDE, Paris.
- 10) Barton, H.A., *et al.* (2006), The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology*, 36: 9-35.
- 11) Milo Gibaldi et Donald Perrier (1982), *Pharmacokinetics*, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

ANNEXE : DÉFINITIONS

Absorption: processus par le(s)quel(s) une substance pénètre dans, ou traverse, des tissus. L'absorption se réfère au composé parent et à tous ses métabolites. À ne pas confondre avec la « biodisponibilité ».

Absorption orale: pourcentage de la dose de substance d'essai absorbé à partir du site d'administration (à savoir le tractus gastro-intestinal). Ce paramètre essentiel peut permettre de comprendre quelle proportion de la substance d'essai administrée atteint la veine porte, et par la suite le foie.

Accumulation (bioaccumulation): augmentation dans le temps de la quantité d'une substance présente dans les tissus (généralement les tissus adipeux, à la suite d'une exposition répétée); si une substance pénètre dans le corps à une vitesse supérieure à son taux d'élimination, cette substance s'accumule dans l'organisme et peut atteindre des concentrations toxiques.

ADME: acronyme pour « Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion ».

AUC: (aire sous la courbe des concentrations plasmatiques): aire sous la courbe dans un diagramme représentant l'évolution dans le temps de la concentration d'une substance dans le plasma. Cette aire correspond à la quantité totale de substance absorbée par le corps pendant une période de temps prédéfinie. Dans des conditions de linéarité, l'AUC (du temps zéro à l'infini) est proportionnelle à la quantité totale de substance absorbée par le corps, indépendamment du taux d'absorption.

Autoradiographie (autoradiographie du corps entier): cette technique, qui sert à déterminer qualitativement et/ou quantitativement la localisation tissulaire d'une substance radioactive, utilise l'imagerie par rayons X ou, innovation plus récente, l'imagerie numérique par plaque au phosphore pour visualiser les molécules ou fragments de molécules radiomarqués en enregistrant le rayonnement émis au sein de l'objet étudié. Par rapport à la dissection des organes, l'autoradiographie quantitative du corps entier peut présenter des avantages pour évaluer la distribution de la substance d'essai, la récupération globale et la résolution du matériau radioactif dans les tissus. Par exemple, on peut utiliser cette technique sur un modèle animal pigmenté, afin d'évaluer l'association possible de la substance d'essai avec la mélanine, qui peut se lier à certaines molécules. Cependant, tout en offrant un moyen commode de visualiser l'ensemble des sites de fixation de grande capacité et de faible affinité dans le corps entier, cette technique est probablement moins performante pour identifier des sites cibles spécifiques tels que les sites de liaison au récepteur, dont la détection nécessite une résolution et une sensibilité relativement élevées. Lorsqu'on recourt à l'autoradiographie, les expériences visant à déterminer le bilan massique du composé administré sont menées sur un groupe séparé ou dans le cadre d'une étude distincte de l'étude de distribution tissulaire, dans laquelle tous les excréta (qui peuvent inclure également l'air expiré) et toutes les carcasses sont homogénéisés et analysés par comptage à scintillation liquide.

Autoradiographie microscopique des récepteurs (microautoradiographie des récepteurs): cette technique peut servir à étudier l'interaction xénobiotique avec des sites tissulaires ou des populations cellulaires spécifiques, par exemple dans le cadre d'études sur la fixation au récepteur ou le mode d'action spécifique qui peuvent nécessiter une qualité de résolution et de sensibilité impossible à obtenir par d'autres techniques comme l'autoradiographie du corps entier.

Bilan massique: comptabilité des entrées de la substance d'essai dans le système, et de ses sorties de celui-ci.

Bilan matière: voir « bilan massique ».

Bioaccumulation: voir « Accumulation ».

Biodisponibilité: fraction d'une dose administrée qui atteint la circulation systémique ou est rendue disponible sur le site de l'activité physiologique. Généralement, la biodisponibilité d'une substance se réfère au composé parent, mais elle peut également se référer à ses métabolites. Elle ne tient compte que d'une seule forme chimique. *Nota bene* : biodisponibilité et absorption ne sont pas synonymes. La différence, par exemple, entre l'absorption orale (c'est-à-dire la présence dans la paroi intestinale et la veine porte) et la biodisponibilité (c'est-à-dire la présence dans le sang systémique et dans les tissus) peut, entre autres facteurs, provenir de la dégradation chimique liée au métabolisme de la paroi intestinale, à l'efflux vers la lumière intestinale ou encore au métabolisme présystémique dans le foie (8). La biodisponibilité du composant toxique (composé parent ou métabolite) est un paramètre essentiel, dans l'évaluation des risques pour la santé humaine (extrapolation de dose élevée à faible, extrapolation de voie à voie), pour dériver une valeur interne de la dose sans effet nocif observé (DSENO) ou de la dose de référence (BMD) externes (dose appliquée). Pour étudier les effets sur le foie en cas d'administration orale, l'absorption orale suffit. Néanmoins, pour évaluer tout autre effet que l'effet à la porte d'entrée, la biodisponibilité est généralement un paramètre plus fiable pour l'évaluation des risques.

Biopersistance: voir « persistance ».

Biotransformation: conversion chimique (généralement enzymatique), dans le corps, d'une substance donnée en une autre. Synonyme de « métabolisme ».

C_{max}: concentration maximale (pic de concentration) dans le sang (plasma/sérum) après l'administration, ou excrétion maximale (pic d'excrétion) urinaire ou fécale après l'administration.

Coefficient de partage: également appelé coefficient de distribution, il mesure la solubilité différentielle d'une substance dans deux solvants.

Compartiment: portion (ou unité) structurelle ou biochimique d'un corps, d'un tissu ou d'une cellule séparée du reste de ce corps, de ce tissu ou de cette cellule.

Concentration sanguine (plasmatique) à l'état stationnaire: état hors équilibre d'un système ouvert dans lequel toutes les forces agissant sur le système sont exactement contrebalancées par des forces opposées, de sorte que tous les composants du système ont une concentration stationnaire, bien que de la matière s'écoule au travers de ce système.

Concentration sanguine (plasmatique/sérique) maximale: concentration maximale (pic de concentration) dans le sang (plasma/sérum) après l'administration (voir aussi « C_{max} »).

Demi-vie (t_{1/2}): temps nécessaire pour que la concentration de la substance d'essai diminue de moitié dans un compartiment. Elle se réfère généralement à la concentration plasmatique ou à la quantité de substance présente dans l'ensemble du corps.

Distribution: dispersion d'une substance et de ses dérivés au travers d'un organisme.

Distribution tissulaire: déplacement réversible d'une substance d'un endroit du corps à un autre. La distribution tissulaire peut s'étudier par dissection, homogénéisation, combustion et comptage par scintillation liquide des organes ou par autoradiographie qualitative et/ou quantitative du corps entier. La première méthode est utile pour obtenir la concentration et le pourcentage de récupération dans les tissus et la carcasse des mêmes animaux, mais peut avoir une résolution trop faible pour tous les tissus et atteindre une récupération globale inférieure à l'optimum (< 90 %). Voir la définition de l'autoradiographie.

Enzymes/isoenzymes: protéines qui catalysent des réactions chimiques. Les isoenzymes sont des enzymes qui catalysent des réactions chimiques similaires mais diffèrent par leur séquence d'acides aminés.

Excrétion: processus par le(s)quel(s) une substance administrée et/ou ses métabolites sont éliminés du corps.

Excrétion biliaire: excrétion par les voies biliaires.

Exogène: d'origine extérieure à l'organisme ou au système, ou produit à l'extérieur de lui.

Extrapolation: inférence d'une ou de plusieurs valeurs inconnues à partir de ce qui est connu ou a été observé.

Induction/induction enzymatique: synthèse d'enzymes en réponse à un stimulus environnemental ou à une molécule inductrice.

Linéarité/cinétique linéaire: en cinétique, un processus est linéaire quand tous les taux de transfert entre compartiments sont proportionnels aux quantités ou aux concentrations présentes, c'est-à-dire de premier ordre. En conséquence, les volumes d'élimination et de distribution sont constants, de même que les demi-vies. Les concentrations obtenues sont proportionnelles au taux d'administration (exposition), et l'accumulation est plus aisément prévisible. On peut juger de la linéarité/non-linéarité en comparant les paramètres pertinents, par exemple l'AUC, après administration de différentes doses ou après exposition unique et exposition répétée. L'absence de dose-dépendance peut indiquer la saturation des enzymes participant au métabolisme du composé; une augmentation de l'AUC après exposition répétée par rapport à une exposition unique peut indiquer une inhibition du métabolisme, et une diminution de l'AUC peut signaler une induction du métabolisme [voir aussi (11)].

Mécanisme (mode) de toxicité/d'action: le mécanisme d'action se réfère aux interactions biochimiques spécifiques par lesquelles une substance produit son effet. Le mode d'action se rapporte aux phénomènes plus généraux conduisant à la toxicité d'une substance.

Métabolisme: synonyme de « biotransformation ».

Métabolites: produits du métabolisme ou des processus métaboliques.

Modélisation systémique (modèle toxicocinétique à base physiologique, à base pharmacocinétique, pharmacocinétique à base physiologique, à base biologique, etc.): modèle abstrait utilisant le langage mathématique pour décrire le comportement d'un système.

Nanomatériau: matériau dont la taille est généralement comprise entre 1 et 100 nm, et qui soit est confiné à une, deux ou trois dimensions, soit présente une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique.

Paramètres enzymatiques: K_m , constante de Michaelis, et V_{max} , vitesse maximale.

Persistance (biopersistance): présence à long terme d'une substance (dans un système biologique) s'expliquant par sa résistance à la dégradation/l'élimination.

Prévision à partir de données croisées: les informations sur les effets mesurés pour un ou plusieurs produits chimiques sont utilisées pour prédire l'effet observé pour le produit chimique cible.

Saturation : état dans lequel un ou plusieurs processus cinétiques (par exemple, absorption, métabolisme ou élimination) sont à leur maximum (c'est-à-dire « saturés »).

Sensibilité: capacité d'une méthode ou d'un instrument de mesure à distinguer entre des réponses correspondant à différents niveaux d'une variable d'intérêt.

Tissu cible: tissu sur lequel se manifeste un effet indésirable majeur d'une substance toxique.

T_{max}: temps nécessaire pour atteindre la C_{max}.

Toxicocinétique (pharmacocinétique): étude de l'absorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion des substances au cours du temps.

Validation des modèles: processus destiné à évaluer si un modèle décrit convenablement les données toxicocinétiques disponibles. Les modèles peuvent être évalués par comparaison statistique ou visuelle de leurs prévisions avec les valeurs expérimentales, en fonction d'une variable indépendante commune (par exemple le temps). L'ampleur de l'évaluation est justifiée en fonction de l'usage escompté du modèle.

Vitesse d'élimination: mesure quantitative de la vitesse à laquelle une substance est éliminée du sang, du plasma ou d'un tissu donné, par unité de temps.

Voie d'administration (orale, intraveineuse, cutanée, par inhalation, etc.): se rapporte aux moyens par lesquels une substance est administrée dans le corps (par exemple, par gavage oral, oralement mélangée à la nourriture, par voie cutanée, par inhalation, en intraveineuse, etc.).

Voies de détoxication: série d'étapes conduisant à l'élimination des substances toxiques du corps, que ce soit par transformation métabolique ou par excrétion.