

## LIGNES DIRECTRICES DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

### Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs

#### INTRODUCTION

1 Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour pour tenir compte des progrès scientifiques. La Ligne directrice 407 originale a été adoptée en 1981. Des modifications y ont été apportées en 1995 afin de tirer davantage d'informations des animaux utilisés dans l'étude, en particulier en matière de neurotoxicité et d'immunotoxicité.

2 L'OCDE a lancé en 1998 une activité prioritaire destinée à réviser les Lignes directrices existantes et à en élaborer de nouvelles pour les essais et le dépistage des perturbateurs endocriniens (8). L'un des objectifs était de mettre à jour la ligne directrice de l'OCDE relative à l'« étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs » (407), en y introduisant des paramètres capables de détecter l'activité endocrinienne des substances d'essai. Le protocole a alors fait l'objet d'un programme international approfondi chargé d'évaluer la pertinence et la praticabilité de ces paramètres additionnels, leur performance pour des produits chimiques à activité (anti)œstrogénique, (anti)androgénique et (anti)thyroïdienne, leur reproductibilité intra- et inter-laboratoires et leur interférence avec les paramètres requis par la version antérieure de la ligne directrice. Les très nombreuses données ainsi recueillies ont été rassemblées et évaluées en détail dans un rapport très complet de l'OCDE (9). La présente mise à jour de la Ligne directrice 407 est le fruit de l'expérience et des résultats accumulés durant le programme international d'essais. Elle permet de mettre certains effets à médiation endocrinienne en perspective avec d'autres effets toxicologiques.

#### REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITATIVES

3 Lors de l'appréciation et de l'évaluation des caractéristiques toxiques d'un produit chimique, la détermination de la toxicité orale à doses répétées peut s'effectuer après avoir obtenu des informations préliminaires sur la toxicité à partir d'essais de toxicité aiguë. La présente Ligne directrice vise à étudier les effets toxiques des produits chimiques sur un large spectre de cibles de toxicité. Elle fournit des informations sur les risques pour la santé que peut entraîner une exposition répétée durant une période de temps relativement limitée, notamment pour le système nerveux, le système immunitaire et le système endocrinien. Concernant ces critères d'effet précis, elle devrait permettre d'identifier des produits chimiques potentiellement neurotoxiques, pouvant justifier des études plus approfondies de cet aspect, et des produits chimiques qui interfèrent avec la physiologie de la thyroïde. Elle pourrait également fournir des données sur les produits chimiques qui affectent les organes reproducteurs mâles et/ou femelles des jeunes animaux adultes et donner des indications sur leurs effets immunologiques.

4 Les résultats issus de la Ligne directrice 407 devraient servir à l'identification des dangers et à l'évaluation des risques. Les résultats obtenus concernant les paramètres endocriniens devraient être interprétés à la lumière du « Cadre conceptuel de l'OCDE pour les essais et l'évaluation des produits chimiques perturbant le système endocrinien » (11). La méthode prévoit une étude basique de toxicité à dose répétée, pouvant être utilisée sur les produits chimiques pour lesquels une étude de 90 jours n'est pas

© OCDE, (2008).

*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.*

justifiée (par exemple quand le volume de production ne dépasse pas certaines limites) ou préalablement à une étude à long terme. La durée d'exposition doit être de 28 jours.

5 Le programme international mené afin de valider les paramètres susceptibles de détecter l'activité endocrinienne d'une substance d'essai a montré que la qualité des données obtenues grâce à cette Ligne directrice dépendra beaucoup de l'expérience du laboratoire pratiquant les essais. Ce constat concerne spécifiquement la détermination histopathologique de changements cycliques dans les organes reproducteurs femelles et la détermination du poids des petits organes hormono-dépendants, difficiles à disséquer. Un document d'orientation a été élaboré en matière d'histopathologie (19). Il est disponible sur le site de l'OCDE à la rubrique consacrée aux Lignes directrices pour les essais de produits chimiques. Il vise à aider les pathologistes dans leurs investigations et à améliorer la sensibilité des essais. Un certain nombre de paramètres ont été identifiés comme indicateurs de toxicité endocrinienne et ont été ajoutés à la ligne directrice. D'autres, dont l'utilité n'a pu être prouvée faute de données suffisantes ou dont la capacité à détecter les perturbateurs endocriniens a été insuffisamment démontrée par le programme de validation, sont proposés comme paramètres facultatifs (voir annexe 2).

6 Sur la base des données produites par le processus de validation, il convient de souligner que la sensibilité de cet essai est insuffisante pour identifier toutes les substances présentant une action (anti)androgénique ou (anti)œstrogénique (9). La présente Ligne directrice ne s'applique pas à un stade de vie très sensible aux perturbations endocriniennes. Elle a pourtant permis, pendant le processus de validation, d'identifier des composés affectant faiblement ou fortement la fonction thyroïdienne, ainsi que des composés agissant fortement ou modérément sur le système endocrinien par le biais des récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes, mais dans la plupart des cas, n'est pas parvenue à identifier les substances agissant sur le système endocrinien en affectant faiblement ces récepteurs. Ainsi ne peut-elle être décrite comme un essai de dépistage de l'activité endocrinienne.

7 Par conséquent, l'absence d'effet lié à ces modes d'action ne peut constituer une preuve de l'absence d'effet sur le système endocrinien. En ce qui concerne les effets à médiation endocrinienne, la caractérisation des composés ne doit donc pas s'appuyer uniquement sur les résultats de la présente Ligne directrice, mais doit être utilisée dans le cadre d'une démarche fondée sur le « poids de la preuve », combinant toutes les données existant sur un produit chimique pour caractériser son action potentielle sur le système endocrinien. C'est pourquoi la prise de décision réglementaire sur l'activité endocrinienne des produits chimiques (caractérisation des composés) doit adopter une méthode large ne s'appuyant pas sur les résultats de cette seule Ligne directrice.

8 Il est entendu que toutes les procédures d'essai utilisant des animaux obéiront aux normes locales en vigueur sur le traitement à leur réserver ; la description des soins et traitements prodigués aux animaux utilisés dans le présent essai correspond donc à des normes de performance minimales qui seront le cas échéant adaptées à la législation locale si celle-ci est plus stricte. D'autres recommandations sur l'humanité du traitement à réserver aux animaux ont été formulées par l'OCDE (14).

9 L'annexe 1 présente les définitions utilisées.

### **PRINCIPE DE L'ESSAI**

10 La substance à tester est administrée quotidiennement par voie orale à différents niveaux de dose à plusieurs groupes d'animaux, à raison d'un niveau de dose par groupe, pendant une période de 28 jours. Chaque jour au cours de cette période, les animaux sont examinés soigneusement afin de déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent ou qui sont euthanasiés au cours de l'essai sont autopsiés et, au terme de l'essai, les animaux survivants sont également euthanasiés et autopsiés. Une étude de 28 jours fournit des informations sur les effets d'une exposition répétée par voix orale et peut indiquer la nécessité d'études

ultérieures plus longues. Elle peut également apporter des informations sur la sélection des concentrations en vue d'études plus poussées. Les données tirées de l'application de la Ligne directrice devraient permettre de caractériser la toxicité de la substance d'essai, d'avoir une indication sur la relation dose réponse et de déterminer la concentration sans effet nocif observé (CSENO).

## **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE**

### **Sélection de l'espèce animale**

11 L'espèce de rongeur préférée est le rat, bien que d'autres espèces de rongeurs puissent être utilisées. Si les paramètres spécifiés dans la Ligne directrice 407 sont étudiés sur une autre espèce de rongeur, une justification détaillée devra être donnée. Bien qu'il soit biologiquement plausible que d'autres espèces répondent aux produits toxiques de manière similaire au rat, l'utilisation d'espèces plus petites peut provoquer une variabilité accrue compte tenu de la difficulté technique à disséquer des organes de plus petite taille. Le rat a été la seule espèce utilisée lors du programme international de validation des paramètres pour la détection des perturbateurs endocriniens. Il convient d'employer de jeunes animaux adultes sains issus de souches de laboratoire courantes. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'administration doit commencer dès que possible après le sevrage et, dans tous les cas, avant l'âge de neuf semaines. Au début de l'étude, les différences de poids entre les animaux utilisés doivent être minimales et ne pas excéder  $\pm 20\%$  de la moyenne du poids pour chaque sexe. Lorsque l'essai est conduit à titre d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme, il est préférable d'utiliser des animaux issus de la même souche et de la même source dans les deux études.

### **Encagement et alimentation**

12 Toutes les procédures doivent respecter les normes locales en vigueur sur le traitement des animaux de laboratoire. La température dans le local d'expérimentation doit être de  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). L'humidité relative doit être d'au moins  $30\%$  et si possible ne pas dépasser  $70\%$ , excepté pendant le nettoyage de la pièce, l'idéal étant  $50\text{-}60\%$ . Pour l'éclairage, on doit utiliser la lumière artificielle et respecter une séquence de 12 heures d'éclairage et 12 heures d'obscurité. Le régime alimentaire peut être un régime classique de laboratoire avec eau potable à satiété. Le choix du régime alimentaire peut être influencé par la nécessité d'assurer un mélange convenable de la substance d'essai, lorsqu'elle est administrée dans la nourriture. Les animaux doivent être encagés par petits groupes du même sexe ; ils peuvent être encagés individuellement si une nécessité scientifique le justifie. Pour l'encagement de groupe, il convient de ne pas dépasser cinq animaux par cage.

13 La nourriture doit être analysée régulièrement à la recherche de contaminants. Un échantillon en sera conservé jusqu'à la finalisation du rapport.

### **Préparation des animaux**

14 De jeunes animaux adultes sains sont répartis au hasard entre le groupe témoin et les groupes traités. Les cages doivent être placées de façon à réduire au minimum l'influence éventuelle de leur disposition sur les résultats. Les animaux sont identifiés individuellement et placés dans les cages au moins cinq jours avant le début de l'étude, pour leur permettre de s'acclimater aux conditions du laboratoire.

### **Préparation des doses**

15 La substance d'essai est administrée par gavage ou dans la nourriture ou l'eau de boisson, la méthode étant choisie en fonction de l'objectif de l'étude et des propriétés physico-chimiques, toxiques et cinétiques de la substance d'essai.

16 Lorsque cela s'avère nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule adéquat. On recommande, de privilégier, dans la mesure du possible, l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse. A défaut, on peut utiliser une solution ou une suspension dans l'huile (par exemple l'huile de maïs) et finalement une solution dans d'autres véhicules. La toxicité des véhicules autres que l'eau doit être connue. La stabilité de la substance d'essai dans le véhicule doit être déterminée.

## **PROTOCOLE**

### **Nombre et sexe des animaux**

17 Au moins 10 animaux (5 femelles et 5 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose. Si on envisage d'euthanasier des animaux au cours de l'essai, il faut accroître le nombre d'animaux d'expérience du nombre d'animaux euthanasiés avant la fin de l'épreuve. On envisagera d'inclure un groupe satellite supplémentaire de 10 animaux (5 par sexe) dans le groupe témoin et dans le groupe traité à la plus forte dose, afin d'observer la réversibilité, la persistance, ou l'apparition tardive des effets toxiques, au moins 14 jours après le traitement.

### **Dosage**

18 De manière générale, au moins trois groupes d'essai et un groupe témoin doivent être utilisés, mais si d'après l'évaluation des autres données aucun effet n'est attendu à la dose de 1000 mg/kg bw/d, un essai limite peut être réalisé. S'il n'existe aucune donnée préalable, une étude préliminaire (animaux de la même souche et de la même provenance) peut être menée pour faciliter la détermination des doses à utiliser. Exception faite de l'exposition avec la substance à tester, les animaux du groupe témoin doivent être traités d'une manière identique à ceux des groupes d'essai. Si un véhicule est employé pour administrer la substance d'essai, on administrera au groupe témoin le plus grand volume de véhicule utilisé.

19 Les niveaux de dose doivent être déterminés en tenant compte de toutes les informations disponibles concernant les propriétés toxiques ou toxico-cinétiques de la substance d'essai ou de substances analogues. La dose la plus élevée doit provoquer des effets toxiques, sans être létale ou causer de sévères souffrances. Une séquence de doses décroissantes doit ensuite être sélectionnée en vue de mettre en évidence tout effet lié à la dose ainsi qu'une concentration sans effet nocif observé (CSENO) à la dose la plus faible. Des intervalles correspondant à un facteur 2 ou 4 sont souvent les plus appropriés entre les doses décroissantes et l'inclusion d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à la fixation de très grands intervalles (par exemple un facteur supérieur à 10) entre les doses.

20 En cas d'observation d'une toxicité générale (par exemple réduction du poids corporel, effets sur le foie, le cœur, les poumons ou les reins, etc.) ou d'autres modifications susceptibles de ne pas constituer une réponse toxique (par exemple diminution de la prise de nourriture, grossissement du foie), les effets observés sur les paramètres neurologiques, endocriniens ou liés au système immunitaire, devront être interprétés avec précaution.

### **Essai limite**

21 Si un essai pratiqué avec une seule dose d'au moins 1000 mg/kg de poids corporel/jour, ou, pour une administration par le biais de la nourriture ou de l'eau, d'un pourcentage équivalent de cette nourriture ou de cette eau (en fonction de la détermination du poids corporel), en suivant le mode opératoire décrit pour cette étude, ne produit aucun effet toxique observable et s'il n'y a pas de raison de penser que la substance soit toxique compte tenu des données dont on dispose au sujet de substances ayant une structure analogue, on peut considérer qu'il n'est pas nécessaire de réaliser une étude complète avec trois niveaux de

dose. L'essai limite s'applique, sauf lorsque les données d'exposition humaine indiquent la nécessité d'utiliser une dose plus élevée.

### **Administration des doses**

22 La substance d'essai est administrée aux animaux quotidiennement, sept jours sur sept, sur une période de 28 jours. Lorsque la substance d'essai est administrée par gavage, les animaux doivent recevoir une dose unique, introduite au moyen d'une sonde gastrique ou d'une canule d'intubation appropriée. Le volume maximal de liquide pouvant être administré en une fois dépend de la taille de l'animal d'expérience. Ce volume ne doit pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel, sauf dans le cas des solutions aqueuses où il peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. Exception faite des substances irritantes ou corrosives, qui provoqueront normalement des effets exacerbés aux concentrations plus élevées, il convient de réduire au minimum la variabilité du volume d'essai en ajustant la concentration pour obtenir un volume constant à toutes les doses.

23 Si la substance d'essai est administrée dans les aliments ou l'eau de boisson, il importe de s'assurer que sa quantité n'interfère ni avec la nutrition normale ni avec l'équilibre hydrique. Lorsque la substance d'essai est incorporée aux aliments, deux possibilités sont offertes : soit le maintien d'une concentration constante dans les aliments (ppm), soit le maintien d'un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux ; il y a lieu de préciser l'option choisie. Si la substance est administrée par gavage, la dose doit être administrée à la même heure chaque jour et ajustée si nécessaire pour rester constante par rapport au poids corporel de l'animal. Lorsqu'une étude à doses répétées sert de d'étude préliminaire à une étude de toxicité à long terme, il faut appliquer le même régime alimentaire dans les deux études.

### **Observations**

24 La période d'observation doit durer 28 jours. Les animaux d'un groupe satellite destinés à des observations ultérieures ne doivent recevoir aucun traitement pendant au moins 14 jours en vue de détecter d'éventuels effets toxiques différés ou persistants, ou de mettre en évidence le rétablissement des animaux traités.

25 Les animaux doivent faire l'objet d'un examen clinique général au moins une fois par jour, de préférence aux mêmes heures, en prenant en considération la période où les effets prévus devraient être les plus marqués après l'administration. L'état de santé des animaux doit être consigné. Au moins deux fois par jour, l'ensemble des animaux fait l'objet d'un constat de morbidité et de mortalité.

26 Tous les animaux doivent faire l'objet d'un examen clinique détaillé, une fois avant la première exposition (pour pouvoir effectuer des comparaisons sur un même individu), et ensuite au moins une fois par semaine. Ces observations doivent être effectuées hors de la cage habituelle, sur une aire standard, de préférence toujours au même moment de la journée. Elles doivent être soigneusement consignées, de préférence en utilisant un système de cotation, explicitement défini par le laboratoire qui réalise l'essai. Il faudrait s'efforcer de minimiser les variations des conditions d'essai et prendre les dispositions nécessaires pour que les examens soient effectués par des observateurs n'ayant pas connaissance du traitement. Les symptômes relevés devraient couvrir les observations suivantes (sans que cette liste soit exhaustive) : modifications de l'état de la peau, de la fourrure, des yeux, des muqueuses, apparition de sécrétions et d'excrétions, et de réactions neuro-végétatives (par exemple, sécrétion de larmes, horripilation, dimension de la pupille, respiration anormale). Il convient également de consigner les changements dans la démarche, la posture et les réactions à la manipulation ainsi que la présence de mouvements cloniques ou toniques, des comportements stéréotypés (par exemple, toilettage excessif, parcours circulaires répétitifs) ou comportements bizarres (par exemple, auto-mutilation, marche à reculons) (2).

27 Lors de la quatrième semaine d'exposition, il faut vérifier la réactivité sensorielle à différents types de stimuli (2) (stimuli auditifs, visuels et proprioceptifs, par exemple) (3) (4) (5), et évaluer la force de préhension (6) et l'activité motrice (7). On trouvera dans les références bibliographiques susmentionnées une description plus détaillée des modes opératoires. Toutefois, on peut également utiliser d'autres modes opératoires que ceux qui figurent dans les références.

28 Les observations fonctionnelles réalisées au cours de la quatrième semaine d'exposition peuvent être omises lorsque l'essai sert d'étude préliminaire à une étude subchronique ultérieure (90 jours). Dans ce cas, les observations fonctionnelles devront être menées au cours de la seconde étude. Cela étant, les données tirées des observations fonctionnelles de l'étude à doses répétées peuvent faciliter la sélection des doses retenues pour l'étude subchronique ultérieure.

29 A titre exceptionnel, les observations fonctionnelles peuvent aussi être omises pour des groupes qui par ailleurs présentent des symptômes de toxicité à un degré tel qu'ils interféreraient sensiblement avec le déroulement de l'essai fonctionnel.

30 Lors de l'autopsie, le cycle œstral de l'ensemble des femelles peut être déterminé (facultatif) par frottis vaginal. Ces observations fourniront des informations sur le stade du cycle œstral atteint au moment de l'euthanasie et faciliteront l'évaluation histologique des tissus sensibles aux œstrogènes (voir le guide d'orientations sur l'histopathologie [19]).

#### **Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau**

31 Tous les animaux doivent être pesés au moins une fois par semaine. La consommation de nourriture doit également être mesurée au moins une fois par semaine. Si la substance d'essai est administrée dans l'eau de boisson, la consommation d'eau doit aussi être mesurée au moins une fois par semaine.

#### **Hématologie**

32 A la fin de la période d'essai, il faut procéder aux examens hématologiques suivants: hématocrite, concentration d'hémoglobine, numération des érythrocytes, réticulocytes, numération et formule leucocytaire, numération des plaquettes et mesure du temps et potentiel de coagulation. D'autres analyses devant être menées si la substance d'essai ou ses métabolites supposés ont ou sont susceptibles d'avoir des propriétés oxydantes portent notamment sur la concentration de méthémoglobine et les corps de Heinz.

33 Des échantillons de sang doivent être prélevés à un endroit spécifié juste avant ou pendant la procédure d'euthanasie des animaux, et stockés dans des conditions appropriées. Les animaux doivent avoir jeûné la nuit précédant l'euthanasie<sup>1</sup>.

#### **Biochimie clinique**

---

<sup>1</sup> Il est préférable de faire jeûner les animaux durant la nuit qui précède la prise de sang pour un certain nombre de dosages dans le sérum et le plasma, surtout pour le dosage du glucose. Cette recommandation est principalement motivée par l'accroissement de variabilité qui découlerait inévitablement d'une non-observation du jeûne et qui tendrait à masquer des effets plus subtils, rendant de ce fait l'interprétation des résultats plus difficile. En revanche, l'observation du jeûne durant une nuit entière risque de perturber le métabolisme général des animaux et, notamment lors d'études où la substance d'essai est administrée dans la nourriture, risque de perturber l'exposition quotidienne à la substance d'essai. Si la pratique du jeûne durant la nuit est adoptée, les analyses de biochimie clinique doivent être réalisées après les observations fonctionnelles faites au cours de la quatrième semaine de l'étude.

34 Les analyses de biochimie clinique destinées à étudier les principaux effets toxiques sur les tissus, et en particulier sur le rein et le foie, devraient être pratiquées sur des échantillons de sang prélevés sur tous les animaux juste avant ou pendant leur euthanasie (à l'exception des animaux trouvés moribonds et/ou euthanasiés avant la fin de l'essai). Les analyses du plasma ou du sérum doivent porter sur le sodium, le potassium, le glucose, le cholestérol total, l'urée, la créatinine, la concentration totale de protéines et d'albumine, au moins deux enzymes indicatrices des effets hépatocellulaires (telles que l'alanine aminotransférase, l'aspartate aminotransférase, la phosphatase alcaline, la gamma glutamyle transpeptidase et la glutamate déshydrogénase), ainsi que sur les acides biliaires. Le dosage d'autres enzymes (d'origine hépatique ou autre) et de la bilirubine, peut fournir des informations utiles dans certaines circonstances.

35 A titre facultatif, on peut effectuer les analyses d'urine suivantes au cours de la dernière semaine de l'étude sur des échantillons d'urine prélevés à des moments déterminés : apparence, volume, osmolalité ou poids spécifique, pH, protéines, glucose, sang et cellules sanguines.

36 Il faudrait envisager par ailleurs de rechercher dans le plasma ou le sérum des marqueurs de lésions générales des tissus. Si les propriétés connues de la substance d'essai risquent ou sont soupçonnées d'affecter certaines voies métaboliques, on devrait procéder à d'autres analyses, notamment celles du calcium, du phosphate, des triglycérides, d'hormones spécifiques et de la cholinestérase. La nécessité de ces analyses doit être déterminée pour certaines classes de produits chimiques ou au cas par cas.

37 Bien que l'évaluation internationale des paramètres liés au système endocrinien n'ait pas pu établir de façon claire l'intérêt de l'analyse des hormones thyroïdiennes (T3, T4) et de la TSH, il peut être utile de conserver des échantillons de plasma ou de sérum pour mesurer la T3, la T4 et la TSH (facultatif) s'il semble qu'un effet sur l'axe hypophyso-thyroïdien puisse exister. Ces échantillons pourront être congelés à -20 °C pour être stockés. Les facteurs suivants peuvent influencer la variabilité et les concentrations absolues lors de l'analyse hormonale :

- moment de l'euthanasie, en raison de la variation diurne des concentrations hormonales ;
- méthode d'euthanasie, évitant de stresser inutilement les animaux, ce qui pourrait affecter leurs concentrations hormonales ;
- kits d'analyse hormonale pouvant différer par leurs courbes standard.

L'identification définitive des substances chimiques actives sur le système thyroïdien s'appuiera de manière plus fiable sur l'analyse histopathologique que sur les niveaux hormonaux.

38 Les échantillons de plasma destinés spécifiquement à l'analyse hormonale doivent être prélevés aux mêmes heures de la journée. Il est recommandé de prendre en considération les taux de T3, T4 et TSH provoqués par des altérations de l'histopathologie de la thyroïde. Les valeurs numériques obtenues lors de l'analyse des concentrations hormonales diffèrent selon les kits d'essai du commerce utilisés. Il peut ainsi ne pas être possible de fournir des critères de performance fondés sur des données historiques homogènes. Pour pallier cet inconvénient, les laboratoires s'efforceront de maintenir les coefficients de variation en dessous de 25 pour la T3 et pour la T4 et de 35 pour la TSH. Toutes les concentrations doivent être exprimées en ng/ml.

39 Si les données de référence historiques sont inappropriées, il conviendra de prendre en compte les variables d'hématologie et de biochimie clinique avant le début du dosage ou de préférence sur un groupe d'animaux distincts des groupes d'essai.

## **PATHOLOGIE**

### **Autopsie générale**

40 Tous les animaux utilisés dans l'étude feront l'objet d'une autopsie générale, complète et détaillée, qui comporte un examen approfondi de la surface externe du corps, de tous les orifices ainsi que des cavités crânienne, thoracique et abdominale et de leur contenu. Le foie, les reins, les glandes surrénales, les testicules, les épididymes, l'ensemble formé par la prostate, les vésicules séminales et les glandes coagulantes, le thymus, la rate, le cerveau et le cœur de tous les animaux (à l'exception des animaux moribonds et/ou euthanasiés avant la fin de l'essai) doivent être débarrassés, le cas échéant, de tout tissu adhérent et pesés à l'état frais dès que possible après la dissection, afin d'éviter leur dessiccation. Il convient d'enlever très soigneusement les tissus adhérents de l'ensemble de la prostate, de façon à éviter toute ponction de la vésicule séminale remplies de liquide. Une alternative consistera à débarrasser la vésicule séminale et la prostate des tissus adhérents et de les peser après fixation.

41 De manière facultative, deux autres organes peuvent aussi être pesés dès que possible après la dissection, afin d'éviter leur dessiccation : les deux ovaires (poids frais) et l'utérus, y compris le col de l'utérus (des orientations sur l'ablation et la préparation des tissus utérins pour leur pesée sont données par la Ligne directrice 440 [18]).

42 Le poids de la thyroïde (facultatif) peut être déterminé après la fixation. L'élimination des tissus adhérents doit également s'opérer avec beaucoup de soin et seulement après la fixation pour éviter d'abîmer les tissus, et par là de compromettre l'analyse d'histopathologie.

43 Les tissus suivants doivent être conservés dans le milieu de fixation le plus approprié compte tenu à la fois du type de tissu et des examens histopathologiques prévus (voir paragraphe 47) : toutes les lésions macroscopiques, l'encéphale (les régions représentatives du cerveau comprenant les hémisphères cérébraux, le cervelet et la protubérance annulaire), la moelle épinière, les yeux, l'estomac, l'intestin grêle, le gros intestin (y compris les plaques de Peyer), le foie, les reins, les glandes surrénales, la rate, le cœur, le thymus, la thyroïde, la trachée et les poumons (préservé par injection de fixateur, puis immergés), les gonades (testicules et ovaires), les organes génitaux auxiliaires (utérus et col de l'utérus, épididymes, prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes), le vagin, la vessie, les ganglions lymphatiques (le ganglion lymphatique le plus proximal et un autre, en fonction de l'expérience du laboratoire [15]), un nerf périphérique (sciatique ou poplitée interne), de préférence tout près du muscle, un muscle squelettique et un os, avec la moelle osseuse (coupe ou à défaut une ponction examinée immédiatement). Il est recommandé de fixer les testicules par immersion dans un fixateur de Bouin ou de Davidson modifié (16) (17). L'albuginée du testicule doit être ponctionnée délicatement et superficiellement aux deux pôles de l'organe avec une aiguille pour permettre la pénétration rapide du fixateur. Les résultats des observations cliniques et autres peuvent conduire à l'examen de tissus supplémentaires. En outre, il y a lieu de conserver tout organe qui pourrait être considéré comme un organe cible possible, eu égard aux propriétés connues de la substance à tester.

44 Les tissus suivants peuvent apporter des informations utiles sur les effets endocriniens : gonades (ovaires et testicules), organes génitaux auxiliaires (utérus et col de l'utérus, épididymes, vésicules séminales et glande coagulante, prostate dorsolatérale et ventrale), vagin, hypophyse, glande mammaire mâle, glande thyroïdienne et glande surrénale. Les changements survenant dans les glandes mammaires mâles n'ont pas encore été insuffisamment documentés, mais ce paramètre peut s'avérer très sensible aux substances à action œstrogénique. L'observation des organes/tissus non cités au paragraphe 43 est facultative (voir annexe 2).

45 Le Document d'orientation sur l'histopathologie (19) fournit des informations supplémentaires sur la dissection, la fixation, le prélèvement et l'histopathologie des tissus endocriniens.

46 Au cours du programme d'essais international, des éléments de preuve ont été apportés montrant que des effets subtils sur le système endocrinien de substances chimiques susceptibles de faiblement déséquilibrer l'homéostasie des hormones sexuelles peuvent être identifiés par leur capacité à perturber la synchronisation du cycle œstral dans différents tissus plutôt que par une nette altération histopathologique des organes sexuels femelles. Bien qu'aucune preuve définitive n'ait été apportée sur ces effets, il est recommandé que les preuves d'une asynchronie possible du cycle oestral soient prises en compte dans l'interprétation de l'examen histopathologique des ovaires (cellules folliculaires, thécales et de la granulosa), de l'utérus, du col de l'utérus et du vagin. Si elle est évaluée (facultatif), la période du cycle déterminée par les frottis vaginaux peut également être incluse dans cette comparaison.

### **Histopathologie**

47 Un examen histopathologique complet doit être pratiqué sur les tissus et organes conservés de tous les animaux appartenant au groupe témoin et au groupe traité à la dose la plus élevée. Ces examens devront être étendus aux animaux de tous les autres groupes de dosage dès lors qu'on observe des modifications liées au traitement dans le groupe traité à la dose la plus élevée.

48 Toutes les lésions macroscopiques seront examinées.

49 Si un groupe satellite est inclus, les tissus et organes sur lesquels des effets ont été observés dans les groupes traités doivent faire l'objet d'un examen histopathologique.

### **RÉSULTATS ET RAPPORT**

#### **Résultats**

50 Il faut présenter les résultats correspondant à chaque animal. En outre, toutes les données doivent être résumés sous forme de tableaux faisant apparaître, pour chaque groupe d'essai, le nombre d'animaux au début de l'essai, le nombre d'animaux trouvés morts au cours de l'essai ou euthanasiés, le moment de la mort ou de l'euthanasie, le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, et une description des ces signes, notamment le moment de leur apparition, leur durée et leur gravité, le nombre d'animaux présentant des lésions, les types de lésions, leur gravité et le pourcentage d'animaux affecté par chaque type de lésion.

51 Dans la mesure du possible, les résultats numériques devraient être évalués par une méthode statistique appropriée et largement reconnue. La comparaison des effets au sein d'une même fourchette de dosage devrait éviter d'avoir à recourir à des tests de *t* multiples. Les méthodes statistiques devront être sélectionnées au stade de la conception de l'étude.

52 À des fins de contrôle de la qualité, il est suggéré de recueillir des données de contrôle historiques et de calculer les coefficients de variation pour les données numériques, en particulier pour les paramètres liés à la détection des perturbateurs endocriniens. Ces données peuvent être utilisées à des fins comparatives lorsque des études réelles sont évaluées.

#### **Rapport d'essai**

53 Le rapport d'essai doit inclure les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique, pureté et propriétés physico-chimiques ;
- données permettant l'identification chimique.

Véhicule, le cas échéant :

- justification du choix du véhicule, s'il est autre que l'eau.

Animaux d'essai :

- espèce/souche utilisée ;
- nombre, âge et sexe des animaux ;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, etc. ;
- poids de chaque animal au début de l'essai ;
- justification du choix de l'espèce s'il ne s'agit pas de rats.

Conditions d'essai :

- justification du choix des doses ;
- description détaillée de la formulation de la substance à tester et/ou de son incorporation dans la nourriture, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation ;
- détails relatifs à l'administration de la substance d'essai ;
- conversion de la concentration de la substance d'essai dans la nourriture ou l'eau de boisson (en ppm) en dose réelle (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu ;
- détails concernant la qualité de la nourriture et de l'eau.

Paramètres optionnels étudiés :

- liste des paramètres facultatifs étudiés.

Résultats :

- poids corporel/variation du poids corporel ;
- consommation de nourriture et d'eau, le cas échéant ;
- données sur la réponse toxique par sexe et par dose et description des symptômes de toxicité ;
- nature, gravité et durée des observations cliniques (réversibles ou non) ;
- évaluations de l'activité sensorielle, de la force de préhension et de l'activité motrice ;
- analyses de sang et valeurs normales de référence ;
- analyses de biochimie clinique et valeurs normales de référence ;
- poids corporel lors de l'euthanasie et poids des organes ;
- résultats d'autopsie ;
- description détaillée de tous les résultats des examens histopathologiques ;
- données relatives à l'absorption, si elles sont disponibles ;
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu.

Discussion des résultats.

Conclusions.

## ANNEXE 1

**DÉFINITIONS**

Dose : quantité de substance d'essai administrée. La dose est exprimée en poids de substance d'essai par unité de poids de l'animal d'expérience par jour (par exemple en mg/kg de poids corporel/jour), ou en concentration constante dans la nourriture.

Dosage : terme général recouvrant la dose, sa fréquence et la durée de l'administration.

Toxicité manifeste : terme général désignant des signes évidents de toxicité qui surviennent à la suite de l'administration d'une substance d'essai. Ces signes doivent être suffisants pour permettre l'évaluation des dangers et doivent être tels qu'on puisse s'attendre à ce qu'une augmentation de la dose administrée entraîne l'apparition de signes de toxicité grave et probablement la mort.

CSENO : sigle pour « concentration (maximale) sans effet nocif observé », c'est-à-dire la dose la plus élevée à laquelle aucun effet nocif lié au traitement n'est observé.

Œstrogénicité : capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone œstrogénique naturelle (par exemple l'œstradiol 17β) chez un mammifère.

Androgénicité : capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un mammifère.

Activité thyroïdienne : capacité d'un produit chimique à agir comme une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple la T<sub>3</sub>) chez un mammifère.

Activité antiœstrogénique : capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone œstrogénique naturelle (par exemple l'œstradiol 17β) chez un mammifère.

Activité antiandrogénique : capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone androgénique naturelle (par exemple la testostérone) chez un mammifère.

Activité antithyroïdienne : capacité d'un produit chimique à supprimer l'action d'une hormone thyroïdienne naturelle (par exemple la T<sub>3</sub>) chez un mammifère.

Validation : processus scientifique destiné à caractériser les impératifs opérationnels et les limites d'une méthode d'essai et à démontrer sa fiabilité et sa pertinence pour un objectif particulier.

## ANNEXE 2

**Paramètres recommandés dans la Ligne directrice 407 pour la détection des perturbateurs endocriniens**

Paramètres obligatoires	Paramètres optionnels
Poids	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Testicules</li> <li>- Épididymes</li> <li>- Glandes surrénales</li> <li>- Prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ovaires</li> <li>- Utérus, y compris col de l'utérus</li> <li>- Thyroïde</li> </ul>
Histopathologie	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gonades :               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Testicules et</li> <li>- Ovaires</li> </ul> </li> <li>- Organes sexuels auxiliaires:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Épididymes,</li> <li>- Prostate + vésicules séminales et glandes coagulantes</li> <li>- Utérus, y compris col de l'utérus</li> </ul> </li> <li>- Glandes surrénales</li> <li>- Thyroïde</li> <li>- Vagin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Frottis vaginaux</li> <li>- Glandes mammaires mâles</li> <li>- Hypophyse</li> </ul>
Dosages hormonaux	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Niveaux circulants de T3 et deT4</li> <li>-Niveaux circulants de TSH</li> </ul>

LITTÉRATURE

- (1) OCDE (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting du Groupe de travail ad hoc d'experts en neurotoxicité systémique à court terme (et différée).
- (2) PISC (1986) Principes et méthodes de la neurotoxicité liée à l'exposition aux produits chimiques. Critères d'hygiène de l'environnement n°60.
- (3) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.
- (4) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health*, 9, 691-704.
- (5) Moser, V.C., McDaniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
- (6) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233-236.
- (7) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 599-609.
- (8) OCDE (1998). Rapport de la première réunion du Groupe d'étude sur les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens, 10 et 11 mars 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (9) OCDE. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.
- (10) OCDE. (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.
- (11) OCDE (2002). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. [http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr\\_2649\\_37407\\_2348794\\_1\\_1\\_1\\_37407,00.html](http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html)
- (12) OCDE (2006). Compte rendu final de la réunion du Groupe de gestion de la validation pour les essais sur les mammifères. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.
- (13) OCDE (2006). Projet de compte rendu du Groupe d'étude sur les essais et l'évaluation des perturbateurs endocriniens. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.
- (14) OCDE (2000) Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (15) P. Haley, R. Perry, D. Ennulat, S. Frame, C. Johnson, J.-M. Lapointe, A. Nyska, P.W. Snyder, D. Walker, and G. Walter (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. *Toxicol Pathol* 2005 33: 404-407.

(16) Hess RA, Moore BJ. (1993) Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(17) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OCDE (2007). Ligne directrice pour les essais de produits chimiques de l'OCDE n°440: Bio-essai utéro-trophique chez les rongeurs : Essai de dépistage à court terme des propriétés œstrogéniques.

(19) OCDE. (2008). Guidance Document on histopathology. Endocrine disruption: Guidelines for histological evaluation (draft). Series on Testing and Assessment.