

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

Étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations

INTRODUCTION

1. À Copenhague, en juin 1995, le Groupe de travail de l'OCDE sur la toxicité pour la reproduction et le développement s'est penché sur la nécessité de mettre à jour les Lignes directrices relatives à la toxicité pour la reproduction et le développement et d'établir de nouvelles Lignes directrices pour les effets non encore couverts. Le Groupe de travail a recommandé que la Ligne directrice ayant trait à la toxicité pour la reproduction sur deux générations soit révisée d'après les propositions des États-Unis et de l'Allemagne. Le Groupe de travail a approuvé tous les éléments majeurs de la version révisée de cette Ligne directrice (1).

CONSIDÉRATIONS INITIALES

2. La présente Ligne directrice relative à la toxicité pour la reproduction sur deux générations est destinée à livrer des informations générales concernant les effets d'une substance d'essai sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles, notamment la fonction gonadique, le cycle oestral, le comportement à l'égard de l'accouplement, la conception, la gravidité, la mise-bas, la lactation, le sevrage ainsi que la croissance et le développement de la descendance. L'étude peut aussi montrer les effets de la substance d'essai sur la morbidité et la mortalité néonatales, fournir des données préliminaires sur la toxicité prénatale et postnatale pour le développement et orienter des essais ultérieurs. Cette Ligne directrice étudie non seulement la croissance et le développement de la génération F1, mais évalue aussi l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles, ainsi que la croissance et le développement de la génération F2. Il est possible d'obtenir des informations supplémentaires sur la toxicité pour le développement et les déficits fonctionnels, en complétant le présent protocole d'après les Lignes directrices se rapportant à la toxicité pour le développement et/ou à la neurotoxicité pour le développement, ou, en étudiant ces effets dans le cadre d'autres essais, en utilisant les Lignes directrices appropriées.

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. La substance d'essai est administrée à différentes doses échelonnées suivant une gradation à plusieurs groupes de mâles et de femelles. On administre la substance aux mâles de la génération P (génération parentale) durant leur croissance et pendant au moins un cycle spermatogène complet (environ 56 jours chez la souris et 70 jours chez le rat) afin de faire apparaître tous ses effets nocifs sur la spermatogénèse. Les effets sur le sperme sont déterminés d'après plusieurs paramètres, comme la morphologie et la motilité des spermatozoïdes, sur des préparations de tissus et au cours d'un examen histopathologique détaillé. Si l'on dispose de données sur la spermatogénèse provenant d'une étude précédente à doses répétées de durée suffisante, par exemple 90 jours, l'évaluation des mâles de la génération P n'est plus nécessaire. Il est toutefois recommandé de conserver les échantillons ou les enregistrements digitaux du sperme de la génération P, en vue d'une évaluation ultérieure. Les femelles de la génération P doivent recevoir les doses durant leur croissance et sur une période correspondant à plusieurs cycles oestraux complets pour que tous les effets nocifs

de la substance d'essai sur le cycle oestral puissent être détectés. La substance d'essai est administrée aux animaux de la génération P au cours de leur accouplement, des gravidités qui en résultent et jusqu'au sevrage de leur descendance F1. Après le sevrage, la descendance F1 continue de recevoir la substance durant toute sa croissance et l'administration se poursuit au cours de l'accouplement et de la production de la génération F2, jusqu'au sevrage de cette dernière.

4. Tous les animaux subissent un examen clinique et pathologique destiné à mettre en évidence des signes de toxicité ; cet examen s'attache particulièrement aux effets sur l'intégrité et le fonctionnement des appareils reproducteurs mâles et femelles et sur la croissance et le développement de la descendance.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE / PRÉPARATIONS POUR L'ESSAI

Choix des espèces

5. Le rat est l'espèce qui convient le mieux à cet essai. Si on utilise une autre espèce, il faut justifier ce choix et effectuer les adaptations qui s'imposent. Les souches dont le taux de fécondité est bas ou dont la fréquence élevée d'anomalies congénitales est avérée sont à proscrire. Au début de l'étude, la variation pondérale des animaux utilisés doit être minimale et ne pas dépasser 20 pour cent du poids moyen des représentants de chaque sexe.

Conditions d'encagement et d'alimentation

6. L'animalerie doit être à 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$), avec un taux d'humidité relative d'au moins 30 pour cent et de préférence inférieur à 70 pour cent, sauf pendant le nettoyage de la salle, l'idéal qu'il faut tâcher d'atteindre se situant entre 50 et 60 pour cent. On appliquera un éclairage artificiel, avec un cycle de 12 heures de clarté et 12 heures d'obscurité. Un régime alimentaire classique pour animaux de laboratoire, avec eau potable à satiété, conviendra. Le choix des aliments sera guidé par la nécessité d'y incorporer la substance d'essai, si elle est administrée par cette voie.

7. Les animaux peuvent être encagés individuellement ou par petits groupes du même sexe. L'accouplement devrait se dérouler dans des cages propices à cette fin. Après constatation de la copulation, les femelles s'étant accouplées seront placées dans des cages individuelles aménagées pour la mise-bas ou la maternité. Les rates s'étant accouplées peuvent aussi être encagées par petits groupes et séparées un ou deux jours avant la mise-bas. À l'approche de la mise-bas, on leur fournira des matériaux de nidification appropriés et déterminés.

Préparation des animaux

8. Il faudrait utiliser de jeunes animaux sains, acclimatés aux conditions du laboratoire pendant au moins 5 jours et n'ayant pas subi d'autres essais. On indiquera l'espèce, la souche, la source, le sexe, le poids et/ou l'âge des animaux d'expérience. Il faut connaître toutes les relations de fraternité entre les animaux, afin de ne pas accoupler les membres d'une même fratrie. Les animaux sont répartis au hasard entre les groupes témoins et les groupes traités (on recommande de les regrouper par tranche de poids corporel). Les cages

seront placées de façon à réduire au minimum d'éventuels effets résultant de leur disposition. Chaque animal sera désigné par un numéro d'identification propre. Les animaux de la génération P devraient être numérotés avant l'administration des doses ; ceux de la génération F1 qui sont sélectionnés pour l'accouplement, au moment du sevrage. On notera la portée d'origine de tous les animaux de la génération F1 sélectionnés. Il est également recommandé d'identifier chaque petit dès que possible après la naissance, si on envisage de les peser individuellement ou d'effectuer des essais fonctionnels.

9. Les animaux de la génération P seront âgés de 5 à 9 semaines au début de l'administration des doses. Tous les groupes d'essai devront être aussi homogènes que possible quant au poids et à l'âge des animaux.

MODE OPÉRATOIRE

Nombre et sexe des animaux

10. Chaque groupe d'essai ou témoin doit contenir un nombre suffisant d'animaux afin de fournir de préférence au moins 20 femelles gravides, à leur terme ou presque. Pour les substances qui occasionnent des effets indésirables (stérilité, toxicité excessive à la dose élevée, par exemple), cela risque d'être impossible. On cherche à obtenir suffisamment de gravidités pour pouvoir procéder à une évaluation significative de l'action de la substance étudiée sur la fertilité, la gravidité, le comportement maternel et la période d'allaitement, la croissance et le développement de la descendance F1, depuis la conception jusqu'à la maturité, et sur le développement de leur descendance F2 jusqu'au sevrage. Si bien que le fait de ne pas avoir réussi à obtenir le nombre de femelles gravides souhaité (c'est-à-dire 20) n'invalide pas nécessairement l'étude et devrait être évalué au cas par cas.

Préparation des doses

11. Il est recommandé d'administrer la substance d'essai par voie orale (dans la nourriture, l'eau de boisson ou par gavage) à moins qu'une autre voie (cutanée ou par inhalation) soit jugée plus adéquate.

12. S'il y a lieu, la substance d'essai est dissoute ou suspendue dans un véhicule approprié. On recommande, si possible, d'envisager d'abord l'utilisation d'une solution ou d'une suspension aqueuse, puis d'une solution ou d'une émulsion dans l'huile (par exemple l'huile de maïs) et en dernier lieu d'une solution dans d'autres véhicules. Si le véhicule n'est pas aqueux, sa toxicité doit être connue. Il faut déterminer la stabilité de la substance d'essai dans le véhicule.

Dosage

13. On applique au moins trois doses différentes et un blanc en parallèle. Si elle n'est pas limitée par les propriétés physiques, chimiques ou biologiques de la substance d'essai, la dose la plus élevée devrait présenter une certaine toxicité, sans provoquer de décès ni de souffrances aiguës. En cas de mortalité inattendue, les études où le taux de mortalité de la génération parentale est inférieur à environ 10 pour cent devraient normalement encore être acceptables. Il faudrait sélectionner une séquence de doses décroissantes en vue de mettre en évidence une relation dose-effet, le cas échéant, et d'atteindre la concentration maximale sans effet nocif observé (CSENO) ou des doses proches de la limite de détection, ce qui permet de déterminer une dose de référence. Les intervalles optimaux au sein d'une séquence de doses décroissantes sont souvent d'un facteur deux ou quatre et l'adjonction d'un quatrième groupe d'essai est souvent préférable à l'application d'intervalles

très espacés (par exemple supérieurs à un facteur dix). Si la substance d'essai est incorporée à la nourriture, les doses ne devraient pas être espacées par un facteur supérieur à trois. Le choix des doses sera orienté par toutes les données existantes sur la toxicité, en particulier les résultats des études à doses répétées. Toute information sur le métabolisme et la cinétique de la substance d'essai ou d'un composé connexe devrait également être prise en considération. Ces informations serviront aussi à justifier l'adéquation de l'échelle des doses.

14. Le groupe témoin ne sera traité par aucune substance ou par le véhicule, le cas échéant. Mise à part l'administration de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin seront manipulés de la même manière que les animaux traités. Si on utilise un véhicule, le groupe témoin recevra la plus grande quantité utilisée de ce dernier. Dans les cas où la substance d'essai mélangée aux aliments diminue la prise ou l'utilisation de nourriture, il pourrait être nécessaire d'adjoindre un groupe témoin alimenté de la même manière. Les résultats d'études contrôlées destinées à évaluer les effets d'une diminution de la consommation de nourriture sur les paramètres de la reproduction peuvent remplacer l'utilisation d'un groupe témoin alimenté de la même manière.

15. Il convient d'être attentif, le cas échéant, aux effets du véhicule ou des autres additifs sur l'absorption, la répartition, le métabolisme ou la rétention de la substance d'essai ; sur les propriétés chimiques de la substance d'essai, susceptibles de modifier sa toxicité ; ainsi que sur la consommation de nourriture ou d'eau et sur l'état nutritionnel des animaux.

Essai limite

16. Si un essai conduit à une dose d'au moins 1000 mg/kg de poids corporel/jour administrée par voie orale ou incorporée dans la nourriture ou l'eau de boisson selon un pourcentage équivalent, conformément à la méthode décrite dans cette étude, ne révèle aucune toxicité à l'observation et ne devrait induire aucun effet toxique, d'après les données existantes se rapportant aux composés présentant une structure et/ou une action métabolique analogues, il n'est pas indispensable de mener une étude complète sur plusieurs doses différentes. L'essai limite ne s'applique plus si le niveau d'exposition humaine implique qu'il faille utiliser une dose orale plus élevée. Pour d'autres modes d'administration, tels que l'inhalation ou l'application cutanée, les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai, comme la solubilité, peuvent souvent limiter la concentration maximale applicable.

Administration des doses

17. Les animaux devraient recevoir la substance d'essai tous les jours de la semaine. L'administration par voie orale (dans la nourriture, l'eau de boisson ou par gavage) est préférable. Si l'on opte pour un autre mode d'administration, il faut justifier ce choix et apporter les modifications nécessaires, le cas échéant. On appliquera le même mode d'administration à tous les animaux, durant la période expérimentale adéquate. Si la substance d'essai est administrée par gavage, on procédera à l'aide d'une sonde gastrique. Le volume maximal de liquide administré en une seule fois ne devrait pas dépasser 1 ml/100 g de poids corporel (0,4 ml/100 g de poids pour l'huile de maïs), sauf dans le cas des solutions aqueuses où l'on peut aller jusqu'à 2 ml/100 g de poids corporel. S'il ne s'agit pas de substances irritantes ou corrosives dont les effets devraient en principe s'intensifier aux concentrations supérieures, on réduira au minimum la variabilité du volume d'essai en adaptant les concentrations de façon à obtenir un volume constant à toutes les doses. Dans les études par gavage, les petits ne recevront normalement la substance d'essai qu'indirectement, par le lait maternel, jusqu'à ce qu'on leur administre la dose directement à partir du sevrage. Lorsque la substance d'essai est mélangée à la nourriture ou à l'eau de boisson, les petits recevront aussi la substance d'essai directement, dès qu'ils commenceront à s'alimenter tout seuls, pendant la dernière semaine de la période d'allaitement.

18. Il est important de s'assurer que les quantités de substances administrées dans la nourriture ou l'eau de boisson n'interfèrent pas avec la nutrition ou l'équilibre hydrique. Si la substance d'essai est ajoutée à la nourriture, elle peut être administrée à concentration constante dans cette dernière (ppm) ou à dose constante par rapport au poids de l'animal ; il y a lieu de préciser l'option retenue. Si l'on recourt au gavage, il faut toujours administrer la substance d'essai au même moment de la journée et ajuster la dose au moins une fois par semaine pour qu'elle demeure constante par rapport au poids de l'animal. Cet ajustement devra tenir compte de la diffusion placentaire.

Programmes expérimentaux

19. L'administration quotidienne de la substance d'essai aux mâles et aux femelles de la génération P doit débuter quand ils sont âgés de 5 à 9 semaines. Pour les mâles et les femelles de la génération F1, elle débutera au sevrage ; il faut tenir compte du fait qu'il est possible, lorsque la substance d'essai est incorporée à la nourriture ou à l'eau de boisson, que les petits de la génération F1 aient déjà été exposés directement à la substance pendant la période d'allaitement. Les deux sexes des générations P et F1 continueront à recevoir la substance pendant au moins 10 semaines avant la période de l'accouplement. L'administration de la dose aux deux sexes se poursuit pour les durant les deux semaines de la période d'accouplement. Les mâles qui ne serviront plus à l'évaluation des effets sur la reproduction seront euthanasiés et examinés. Les femelles de la génération P continueront à recevoir la substance d'essai tout au long de leur gravidité et jusqu'au sevrage de leur descendance F1. Il sera peut-être nécessaire de modifier le programme de l'administration des doses à la lumière des informations disponibles sur la substance d'essai, notamment à propos de la toxicité, de l'induction métabolique ou de la bioaccumulation. La dose administrée à chaque animal devrait normalement s'appuyer sur la détermination la plus récente de son poids corporel. Toutefois, la prudence s'impose lors de l'ajustement de la dose au cours du dernier tiers de la gravidité.

20. Le traitement des mâles et des femelles P et F1 se poursuivra jusqu'à leur sacrifice. Tous les adultes mâles et femelles P et F1 devraient être euthanasiés une fois qu'ils ne servent plus à l'évaluation des effets sur la reproduction. Les descendants F1 qui n'ont pas été sélectionnés pour l'accouplement et tous les descendants F2 seront euthanasiés après le sevrage.

Déroulement de l'accouplement

Accouplement des parents P

21. Pour chaque accouplement, on réunira une femelle et un mâle traités à la même dose (accouplement 1:1) jusqu'à ce qu'ils aient copulé ou durant deux semaines. Les femelles subiront un examen quotidien destiné à détecter la présence de sperme ou d'un bouchon vaginal. Le jour 0 de la gravidité est défini comme étant celui où l'on observe du sperme ou un bouchon vaginal. Si l'accouplement n'a pas lieu, on peut envisager de faire une deuxième tentative en réunissant les femelles avec des mâles du même groupe, qui ont fait leurs preuves. Les couples doivent être clairement identifiés dans les résultats. On évitera d'accoupler des membres d'une même fratrie.

Accouplement de la descendance F1

22. S'agissant de l'accouplement de la génération F1, on sélectionne au moins un mâle et une femelle de chaque portée, au moment du sevrage, en vue de les accoupler avec d'autres descendants traités à la même dose, mais issus d'une autre portée, afin d'obtenir la génération F2. La sélection des petits au sein d'une même portée doit se faire au hasard s'ils ne diffèrent pas de façon significative quant au poids corporel ou à l'apparence. Si l'on constate de telles différences, on sélectionnera les meilleurs représentants de chaque portée. D'un point de vue pragmatique, il est plus facile d'opérer cette sélection en fonction du poids corporel, mais il pourrait être plus pertinent de se fonder sur l'apparence. Les descendants F1 ne doivent pas être accouplés avant d'avoir atteint leur pleine maturité sexuelle.

23. On évaluera les couples sans descendance afin de déterminer la cause apparente de leur stérilité. Pour ce faire, on pourrait leur fournir des occasions supplémentaires de s'accoupler avec d'autres mâles ou femelles ayant fait leurs preuves, effectuer un examen microscopique des organes reproducteurs et examiner les cycles oestriques et la spermatogenèse.

Deuxième accouplement

24. Dans certains cas, notamment lorsque la taille de la portée est modifiée par le traitement ou qu'on remarque un effet équivoque sur le premier accouplement, on préconise d'accoupler une deuxième fois les adultes P ou F1, afin d'obtenir une deuxième portée. On recommande d'accoupler une deuxième fois les mâles ou les femelles qui n'ont pas engendré de portée avec un reproducteur ou une reproductrice ayant fait ses preuves. Si la production d'une deuxième portée est jugée nécessaire pour chaque génération, les animaux doivent être accouplés pour la deuxième fois environ une semaine après le sevrage de la dernière portée.

Taille de la portée

25. On laisse les animaux mettre bas normalement et élever leur progéniture jusqu'au sevrage. La normalisation de la taille des portées est facultative ; si l'on y recourt, il faut décrire en détail la méthode utilisée.

OBSERVATIONS**Observations cliniques**

26. On procède quotidiennement à une observation clinique générale et, dans le cas du gavage, il faudrait que le choix de l'heure de cette dernière tienne compte du moment où les effets devraient atteindre leur intensité maximale après l'administration. On notera les changements de comportement, les signes de mise-bas prolongée ou difficile et tous les symptômes de toxicité. En outre, chaque animal devrait subir un examen détaillé au moins une fois par semaine, qui sera plus commode à effectuer à l'occasion d'une pesée de l'animal. Deux fois par jour, une fois par jour pendant le week-end, selon les besoins, on recherchera des signes de morbidité et de mortalité sur tous les animaux.

Poids corporel et consommation de nourriture et d'eau chez les animaux parents

27. Les animaux parents (P et F1) sont pesés le jour de la première administration et ensuite au moins une fois par semaine. Les mères (P et F1) sont pesées, au minimum, les jours 0, 7, 14, et 20 ou 21 de leur gravidité,

puis les mêmes jours que leurs portées durant l'allaitement, ainsi qu'à la date où elles sont sacrifiées. Ces observations doivent être consignées individuellement pour chaque animal adulte. Durant la période qui précède l'accouplement et pendant la gravité, on mesure la consommation de nourriture au moins une fois par semaine. La consommation d'eau est relevée au moins une fois par semaine si la substance d'essai est administrée dans l'eau.

Cycle oestral

28. La longueur et la normalité du cycle oestral sont évaluées chez les femelles P et F1 à l'aide de frottis vaginaux, avant l'accouplement, et facultativement pendant la période d'accouplement, jusqu'à ce qu'on constate que l'accouplement a eu lieu. On prélève les cellules vaginales ou cervicales avec soin pour éviter d'agresser la muqueuse et d'induire ainsi une pseudo-gestation (2).

Caractéristiques du sperme

29. On note le poids des testicules et des épидидymes de tous les mâles P ou F1 sacrifiés, en conservant un exemplaire de chaque organe pour l'examen histopathologique (voir paragraphes 39, 42, 44). Les testicules et les épидидymes restant dans un sous-groupe composé d'au moins dix mâles de chaque génération (P et F1) devraient être réservés respectivement à la numération des spermatides résistantes à l'homogénéisation et des spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme. Dans ce même sous-groupe de mâles, on recueillera le contenu de la queue de l'épididyme ou du canal déférent en vue d'évaluer la motilité et la morphologie des spermatozoïdes. Si des effets liés au traitement apparaissent ou si d'autres études démontrent que la substance peut affecter la spermatogenèse, l'évaluation des spermatozoïdes doit être pratiquée sur tous les mâles de chaque groupe de dose, dans le cas contraire, la numération pourra être limitée aux mâles P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus forte.

30. Il faudrait dénombrer la totalité des spermatides testiculaires résistantes à l'homogénéisation et des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme (3)(4). Le nombre de spermatozoïdes mis en réserve dans la queue de l'épididyme peut être déduit de la concentration et du volume des spermatozoïdes dans la suspension utilisée pour compléter les évaluations qualitatives, et du nombre de spermatozoïdes récupérés après le broyage et/ou l'homogénéisation ultérieurs du tissu caudal restant. La numération doit être effectuée au sein du sous-groupe de mâles sélectionnés dans tous les groupes de dose, immédiatement après le sacrifice, à moins qu'on ait réalisé des enregistrements vidéo ou digitaux ou qu'on ait congelé des échantillons en vue d'une analyse ultérieure. Dans ces circonstances, les groupes témoins et traités à la dose la plus élevée peuvent être analysés en premier. Si l'on n'observe pas d'effets liés au traitement (révélés par exemple par la numération, la morphologie ou la motilité des spermatozoïdes), il n'est pas nécessaire d'analyser les autres groupes de dose. Si des effets liés au traitement apparaissent dans le groupe traité à la dose la plus élevée, il faut aussi évaluer les groupes traités aux doses plus faibles.

31. La motilité des spermatozoïdes dans l'épididyme ou le canal déférent est évaluée ou enregistrée en vidéo, immédiatement après le sacrifice. Le liquide dans lequel baignent les spermatozoïdes, prélevé de façon à éviter autant que possible de léser les organes, est dilué en vue de l'analyse de la motilité selon une méthode acceptable (5). Il faudrait déterminer le pourcentage de spermatozoïdes progressivement motiles subjectivement ou objectivement. Si on pratique une analyse du mouvement assistée par ordinateur (6)(7)(8)(9)(10)(11), la motilité progressive s'appuie sur des seuils définis par l'utilisateur pour la vitesse moyenne de trajectoire, la rectilignité ou l'index linéaire. Si les échantillons sont enregistrés en vidéo (12) ou si

les images sont enregistrées autrement au moment de l'autopsie, l'analyse ultérieure pourra se limiter aux mâles P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose la plus élevée, à moins qu'on ait observé des effets liés au traitement, auquel cas il faudra aussi évaluer les groupes traités aux doses plus faibles. En l'absence d'une image vidéo ou digitale, tous les échantillons de tous les groupes traités devront être analysés à l'autopsie.

32. On conduira une évaluation morphologique d'un échantillon de sperme de l'épididyme ou du canal déférent. Il faudrait examiner les spermatozoïdes (au moins 200 par échantillon) dans des préparations fixées et en milieu liquide (13) et les classer en normaux ou anormaux. Les anomalies morphologiques des spermatozoïdes comprennent, par exemple, la fusion, des têtes isolées et des têtes et/ou des queues déformées. L'évaluation devrait être réalisée au sein du sous-groupe de mâles sélectionnés dans tous les groupes de dose, immédiatement après le sacrifice ou ultérieurement d'après les enregistrements vidéo ou digitaux. Les frottis, une fois fixés, peuvent aussi être analysés ultérieurement. Dans ces circonstances, les groupes témoins et traités à la dose la plus élevée peuvent être analysés en premier. Si l'on n'observe pas d'effets liés au traitement (sur la morphologie des spermatozoïdes, par exemple), l'analyse des autres groupes de dose devient superflue. Si des effets liés au traitement apparaissent dans le groupe traité à la dose élevée, on évaluera aussi les groupes traités aux doses plus faibles.

33. Si l'un des paramètres d'évaluation du sperme mentionnés plus haut a déjà été examiné dans le cadre d'une étude de toxicité systémique d'au moins 90 jours, il ne doit pas nécessairement être réévalué au cours de l'étude de la toxicité sur deux générations. Il est cependant recommandé que les échantillons ou les enregistrements vidéo du sperme de la génération P soient conservés, afin de permettre une évaluation ultérieure si nécessaire.

Descendance

34. On examine chaque portée dès que possible après la mise-bas (jour 0 de l'allaitement), afin d'établir le nombre et le sexe des petits, la mortinatalité, le nombre de naissances vivantes et la présence d'anomalies macroscopiques. Il est préférable d'examiner les petits trouvés morts le jour 0, s'ils ne sont pas macérés, pour mettre en évidence d'éventuelles anomalies et déterminer la cause de la mort, et de les conserver. Les petits vivants doivent être comptés et pesés individuellement à la naissance (jour 0 de l'allaitement) ou le jour 1, et pesés régulièrement par la suite, par exemple les jours 4, 7, 14 et 21 de l'allaitement. On note les anomalies physiques et comportementales observées chez les mères ou les petits.

35. Le développement physique de la descendance est consigné essentiellement d'après la prise de poids corporel. D'autres paramètres physiques (ouverture des oreilles et des yeux, sortie des dents, développement de la pilosité, par exemple) peuvent fournir des informations supplémentaires, mais ces observations devraient être faites de préférence dans le cadre des informations relatives à la maturité sexuelle (âge et poids corporel au moment de l'ouverture vaginale ou de la séparation balano-préputiale, par exemple) (14). Il est recommandé d'explorer les fonctions (l'activité motrice, les fonctions sensorielles, l'ontogenèse des réflexes, par exemple) de la descendance F1 avant et/ou après le sevrage, notamment celles qui se rapportent à la maturation sexuelle, si elles ne sont pas explorées dans d'autres études. On détermine l'âge auquel sont survenus l'ouverture vaginale et la séparation balano-préputiale chez les descendants F1 tout juste sevrés, sélectionnés en vue de l'accouplement. Il faudrait mesurer la distance ano-génitale chez les petits F2, le jour de leur naissance, si on constate une altération de la proportion de mâles et de femelles dans la génération F1 ou de la maturation sexuelle.

36. Les observations fonctionnelles ne s'imposent plus dans les groupes chez lesquels la nocivité est évidente (diminution sensible de la prise de poids, etc., par exemple). L'exploration des fonctions, le cas échéant, se fera sur des animaux autres que les petits retenus pour l'accouplement.

Autopsie macroscopique

37. Juste après le sacrifice ou le décès au cours de l'étude, tous les animaux parents (P et F1), tous les petits qui présentent des anomalies externes ou des signes cliniques ainsi qu'au moins un petit, un représentant de chaque sexe et une portée, choisis au hasard dans chaque génération (F1 et F2) devraient subir un examen macroscopique destiné à révéler d'éventuels changements pathologiques ou anomalies structurelles. On porte une attention particulière aux organes de l'appareil reproducteur. Il faudrait examiner les petits moribonds qui ont été euthanasiés et les petits morts, s'ils ne sont pas macérés, pour détecter d'éventuelles anomalies et/ou établir la cause de la mort, et les conserver.

38. On examinera les utérus de toutes les femelles primipares, sans compromettre l'évaluation histopathologique, pour voir s'ils présentent des points d'implantation et les dénombrer.

Pesée des organes

39. Les corps et les organes énumérés ci-dessous de tous les animaux P et F1 sont pesés juste après leur sacrifice (les deux exemplaires des organes qui vont par paires doivent être pesés séparément) :

- Utérus, ovaires ;
- Testicules, épидидymes (entiers et queues) ;
- Prostate ;
- Vésicules séminales avec glandes coagulantes et leurs liquides (le tout) ;
- Cerveau, foie, reins, rate, hypophyse, glande thyroïde, glandes surrénales et organes cibles connus.

40. Les poids corporels des petits F1 et F2 destinés à l'autopsie sont déterminés juste après le sacrifice, de même que le poids du cerveau, de la rate et du thymus du petit, du représentant de chaque sexe et de la portée choisis au hasard (voir au paragraphe 37).

41. Il faudrait, si possible, interpréter les résultats de l'autopsie macroscopique et de la pesée des organes à la lumière des observations effectuées dans d'autres études à doses répétées.

Histopathologie

Animaux parents

42. Les organes et tissus, énumérés ci-après, des animaux parents (P et F1), ou des échantillons représentatifs de ces derniers, seront fixés et stockés dans un milieu propice à l'examen histopathologique.

- Vagin, utérus avec col, et ovaires (conservés dans du liquide de Bouin ou un fixateur comparable) ;
- Un testicule (conservé dans un fixateur approprié), un épидидyme, les vésicules séminales, la prostate et une glande coagulante ;

- Organe(s) cible(s) précédemment identifiés de tous les animaux P et F1 sélectionnés pour l'accouplement.

43. Pour tous les animaux P et F1 du groupe témoin et du groupe traité à la dose élevée, qui ont été sélectionnés pour l'accouplement, il convient d'effectuer un examen histopathologique complet des organes et tissus, énumérés au paragraphe 42, qu'on aura conservés. L'examen des ovaires des femelles P est facultatif. On recherche aussi les organes qui présentent des changements liés au traitement dans les groupes traités à la dose faible et moyenne afin de déterminer plus précisément la CSENO. De plus, une évaluation histopathologique sera pratiquée sur les organes reproducteurs des animaux traités aux doses faibles et moyennes chez lesquels on soupçonne une diminution de la fertilité, par exemple ceux qui ne se sont pas accouplés, n'ont pas conçu, n'ont pas engendré ou n'ont pas donné naissance à des descendants sains ou dont le cycle oestral ou le nombre, la motilité ou la morphologie des spermatozoïdes ont été affectés. On examinera toutes les lésions macroscopiques, telles que des atrophies ou des tumeurs.

44. Il faudrait conduire un examen histopathologique détaillé des testicules (fixés dans du liquide de Bouin ou inclus dans la paraffine, par exemple, et divisés en sections transversales de 4-5 µm d'épaisseur) afin de mettre en évidence des effets liés au traitement, comme une rétention de spermatides, des couches ou des types de cellules germinales manquants, la présence de cellules géantes multinucléées ou le décollement des cellules spermatogènes dans la lumière des tubules séminifères (15). L'examen d'un épидидyme intact doit porter sur la tête, le corps et la queue et peut être effectué par une section longitudinale. On observera l'épididyme pour voir s'il ne s'y produit pas d'infiltration de leucocytes, de changement dans la fréquence des types cellulaires et de phagocytose des spermatozoïdes, et s'il ne renferme pas de cellules aberrantes. L'examen des organes reproducteurs mâles peut être effectué à l'aide d'une coloration à l'acide périodique-Schiff ou à l'hématoxyline.

45. Après la lactation, l'ovaire devrait contenir des follicules primordiaux et des follicules en croissance ainsi que les grands corps jaunes de la lactation. L'examen histopathologique devrait révéler une déplétion qualitative de la population de follicules primordiaux. Les follicules primordiaux des femelles F1 feront l'objet d'une évaluation quantitative ; le nombre d'animaux, le choix de la section ovarienne et la taille des échantillons de sections devraient être statistiquement appropriés à la méthode d'évaluation employée. L'examen inclut la numération des follicules primordiaux, lesquels peuvent être combinés à de petits follicules en croissance, aux fins de la comparaison entre les ovaires des femelles traitées et témoins (16)(17)(18)(19)(20).

Animaux qui viennent d'être sevrés

46. Pour tous les petits qui présentent des anomalies externes ou des signes cliniques et pour au moins un petit, un représentant de chaque sexe et la portée, choisis au hasard dans chaque génération (F1 et F2) et n'ayant pas été sélectionnés pour l'accouplement, les tissus et les organes cibles où apparaissent des anomalies macroscopiques seront fixés et conservés dans un milieu approprié en vue de l'examen histopathologique. La description histopathologique complète des tissus conservés sera particulièrement axée sur les organes de l'appareil reproducteur.

RESULTATS et RAPPORT

Résultats

47. Les résultats obtenus sur chaque animal seront rapportés et résumés sous forme de tableaux, reprenant pour chaque groupe d'essai et chaque génération, le nombre d'animaux présents au début de l'essai, le nombre d'animaux décédés durant l'essai ou euthanasiés, le temps de survie avant le décès ou l'euthanasie, le nombre d'animaux fertiles, le nombre de femelles gravides, le nombre d'animaux manifestant des signes de toxicité, la description des signes de toxicité observés, notamment le moment où ils ont débuté, leur durée et leur gravité, les types d'altérations histopathologiques et toutes les données pertinentes sur la portée.

48. On évaluera les résultats numériques à l'aide d'une méthode statistique appropriée et largement reconnue, qu'il faudra sélectionner au stade de la conception de l'étude. Les modèles statistiques s'appliquant aux relations "dose-effet" peuvent être utiles à l'analyse des résultats. Le rapport devrait fournir suffisamment d'informations sur la méthode d'analyse et le logiciel employés, pour qu'un réviseur ou un statisticien indépendant puisse réévaluer et reconstruire l'analyse.

Évaluation des résultats

49. Les résultats de cette étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations devraient être évalués en fonction des effets observés, notamment à l'autopsie et lors des examens microscopiques. L'évaluation portera sur la relation, ou l'absence de relation, entre la dose de la substance d'essai et la présence, la fréquence et la gravité des anomalies, notamment les lésions macroscopiques, les anomalies qui atteignent les organes cibles identifiés, l'altération de la fertilité, les anomalies cliniques, l'altération de la capacité de reproduction et de l'état général de la portée, les modifications de poids corporel, les effets sur la mortalité et tous les autres effets toxiques. Les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai et, le cas échéant, les données toxicocinétiques devraient être prises en considération lors de l'évaluation des résultats.

50. Une étude de toxicité pour la reproduction correctement menée doit livrer une estimation satisfaisante de la concentration sans effet et permettre de comprendre les effets nocifs sur la reproduction, la parturition, l'allaitement et le développement postnatal, notamment la croissance et la maturation sexuelle.

Rapport

51. Le rapport doit contenir les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique et, s'il y a lieu, propriétés physico-chimiques ;
- nature chimique ;
- degré de pureté.

Véhicule, le cas échéant :

- justification du choix du véhicule s'il diffère de l'eau.

Animaux d'expérience :

- espèce et souche ;
- nombre, âge et sexe ;
- source, conditions d'encagement, régime alimentaire, matériaux de nidification, etc. ;
- poids de chaque animal au début de l'essai.

Conditions d'essai :

- justification de la sélection des doses appliquées ;
- détails concernant la préparation de la substance d'essai ou son incorporation aux aliments, la concentration obtenue, la stabilité et l'homogénéité de la préparation ;
- détails sur l'administration de la substance d'essai ;
- conversion de la concentration de la substance d'essai (ppm) dans la nourriture ou l'eau de boisson en dose administrée (mg/kg de poids corporel/jour), s'il y a lieu ;
- détails concernant la qualité de l'alimentation et de l'eau de boisson.

Résultats :

- consommation de nourriture, et d'eau si elle a été enregistrée, efficacité alimentaire (gain de poids corporel par gramme d'aliments consommés), et consommation de la substance d'essai par les animaux P et F1, sauf pendant la cohabitation et durant au moins le dernier tiers de la période d'allaitement ;
- données sur l'absorption, le cas échéant ;
- poids corporel des animaux P et F1 sélectionnés pour l'accouplement ;
- résultats concernant les portées et le poids des petits ;
- poids corporel au moment du sacrifice et poids absolu et relatif des organes des animaux parents ;
- nature, gravité et durée des signes cliniques (qu'ils soient réversibles ou non) ;
- temps de survie pendant l'étude ou survie des animaux jusqu'au sacrifice ;
- manifestation de la toxicité par sexe et par dose, y compris les index d'accouplement, de fécondité, de gravidité, de natalité, de viabilité et d'allaitement ; le rapport doit mentionner les chiffres ayant servi au calcul de ces index ;
- effets toxiques ou autres sur la reproduction, la descendance, la croissance postnatale, etc. ;
- observations à l'autopsie ;
- description détaillée de toutes les observations histopathologiques ;
- nombre de femelles P et F1 dont le cycle se déroule normalement et longueur du cycle ;
- nombre total de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme, pourcentage de spermatozoïdes progressivement mobiles, pourcentage de spermatozoïdes à morphologie normale et pourcentage de spermatozoïdes par anomalie identifiée ;
- temps écoulé jusqu'à l'accouplement, exprimé en nombre de jours ;
- durée de la gravidité ;
- nombre d'implantations, de corps jaunes, taille de la portée ;
- nombre de naissances vivantes et de pertes après implantation ;
- nombre de petits affectés d'anomalies macroscopiques ; nombre de nains s'il a été déterminé ;
- repères physiques relevés sur les petits et autres données sur le développement postnatal ; il y a lieu de justifier les repères physiques évalués ;
- observations fonctionnelles réalisées selon les besoins sur les petits et les adultes ;

- traitement statistique des résultats, si nécessaire.

Examen des résultats.

Conclusions, y compris les valeurs de CSENO pour les effets sur la mère et les petits.

Interprétation des résultats

52. Une étude de toxicité pour la reproduction sur deux générations fournit des informations sur les effets de l'exposition répétée à une substance, durant toutes les phases du cycle de reproduction. L'étude livre notamment des informations sur les paramètres de la reproduction ainsi que sur le développement, la croissance et la survie des descendants. Les résultats de l'étude devraient être interprétés à la lumière des résultats des études subchroniques, prénatales, de développement, toxicocinétiques et d'autres études disponibles. Les résultats de la présente étude peuvent souvent servir à apprécier la nécessité de réaliser d'autres essais sur une substance chimique. L'extrapolation des résultats de l'étude à l'homme ne vaut que dans une mesure limitée. Ils se prêtent mieux au calcul des concentrations sans effet et des niveaux d'exposition humaine acceptables (20)(21)(22)(23)(24).

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13th-14th June 1995.
- (2) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.
- (3) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.
- (4) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.
- (5) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39-44
- (6) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10:237-244.
- (7) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273
- (8) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.

- (9) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.
- (10) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology, Part A.*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
- (11) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10: 401-415.
- (12) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8:330-337.
- (13) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6:491-505.
- (14) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17:298303.
- (15) Russell, L.D. et al., (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Cleareau, Florida.
- (16) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, *Methods in Toxicology*, Academic, Orlando, Florida.
- (17) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: *Growth Factors and the Ovary*, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.
- (18) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.
- (19) Smith, B.J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5:379-383.
- (20) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.
- (21) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.
- (22) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

- (23) Palmer, A.K. (1981). In: *Developmental Toxicology*, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.
- (24) Palmer, A.K. (1978). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York